

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860992

研究課題名(和文) グルタミン酸-グルタミンサイクルの機能異常と酢酸の取り込みに関する検討

研究課題名(英文) Relationship between inhibition of glutamate-glutamine cycle and ¹⁴C-Acetate uptake in rat brain

研究代表者

柳本 和彦 (YANAMOTO, Kazuhiko)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70531531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞とグリア細胞との間におけるグルタミン酸-グルタミン(Glu-Gln)サイクルの機能異常下における¹⁴C標識酢酸の取り込み量の変化について検討を行った。神経細胞又はグリア細胞を破壊する薬剤をラット脳内に直接微量注入しGlu-Glnサイクルを破綻させた結果、¹⁴C標識酢酸の取り込み量が低下することが判明した。またGlu-Glnサイクルのうちグリア細胞へのグルタミン酸の取り込み過程をジヒドロカイニン酸の脳内注入で阻害した場合にも¹⁴C標識酢酸の取り込みが低下した。これらの研究結果より¹⁴C標識酢酸の取り込み量はグリア細胞へのグルタミン酸の取り込み過程の影響を受けている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The brain uptake of ¹⁴C-acetate in the dysfunction of glutamate-glutamine (Glu-Gln) cycle between neuron and glia was measured. In the neuronal or glial cells-lesioned rat model, the uptake of ¹⁴C-acetate was decreased in the lesioned area. Furthermore, the ¹⁴C-acetate uptake was also reduced in the dihydrokainate (an inhibitor of glutamate transporter-1)-infused rat brain. These results suggest that the ¹⁴C-acetate uptake into glial cells might be affected by the process of uptake of glutamate into glial cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：酢酸 グリア細胞 グルタミン酸-グルタミンサイクル

1. 研究開始当初の背景

酢酸は脳内においてモノカルボン酸輸送体 (MCT-1) にて細胞内へ取り込まれ、アセチル CoA に代謝変換された後、クエン酸回路で二酸化炭素やグルタミン酸などに代謝変換される (図 1)。酢酸を細胞内へ輸送する MCT-1 は脳内においてはグリア細胞に選択的に発現しているため、³H、¹⁴C や ¹¹C などのラジオアイソトープ (RI) 又は核磁気共鳴法に用いられる ¹³C などで標識された酢酸をグリア細胞のエネルギー代謝の指標として利用できると報告されている。

例えば Wyss らの研究グループは ¹¹C 標識酢酸を用いて ¹¹C 標識酢酸の脳内動態測定を行い、その脳内動態曲線から得られる排泄速度はグリア細胞内のクエン酸回路にて ¹¹C 標識酢酸が ¹¹C 標識二酸化炭素へ代謝変換される過程 (グリア細胞のクエン酸回路の活性) を主に反映していると報告している。(Wyss MT et al., 2011, J Cereb Blood Flow Metab, 31, 1668-1674; Wyss MT et al., 2009, J Cereb Blood Flow Metab, 29, 44-56)

また Hosoi らの研究グループは、グリア細胞のクエン酸回路を選択的に抑制するフルオロクエン酸をラットの片側脳へ微量注入することにより、注入部位における ¹⁴C 標識酢酸の取り込みが著明に低下することを見出している。(Hosoi R et al., 2004, J Cereb Blood Flow Metab, 24, 188-190)

以上の報告例のように、標識酢酸はグリア細胞のエネルギー代謝機能を反映した情報を得るツールとして利用されている。

近年、中枢神経系において神経細胞のみならずグリア細胞も神経伝達系の調節に重要な働きを担っていることが示唆されており、グリア細胞への関心が高い。げっ歯類を用いた実験において、グリア細胞を一過性に消失させたり、神経細胞とグリア細胞との間におけるグルタミン酸 グルタミン (Glu-Gln) サイクルを阻害することによって動物にうつ様行動が認められたことから、うつ病において Glu-Gln サイクルの機能異常が関与していると考えられている。(Banasr M and Duman RS, 2008, Biol Psychiatry, 64, 863-870; Lee Y et al., 2013, J Psychiatry Neurosci, 38, 183-191)

本研究は神経細胞とグリア細胞との間における Glu-Gln サイクルの一部過程を阻害した場合における ¹⁴C 標識酢酸の取り込みを測定することにより、標識酢酸の取り込み量の変化が Glu-Gln サイクルの機能異常を反映した指標になりうるかどうかを検討するものである。

2. 研究の目的

神経細胞とグリア細胞との間における Glu-Gln サイクルの機能異常が RI 標識酢酸の取り込みにどのような影響を与えるのか、また RI 標識酢酸の取り込み量の変化が Glu-Gln

サイクルの機能異常を反映した指標として利用可能かどうかについて検討することを目的とした。

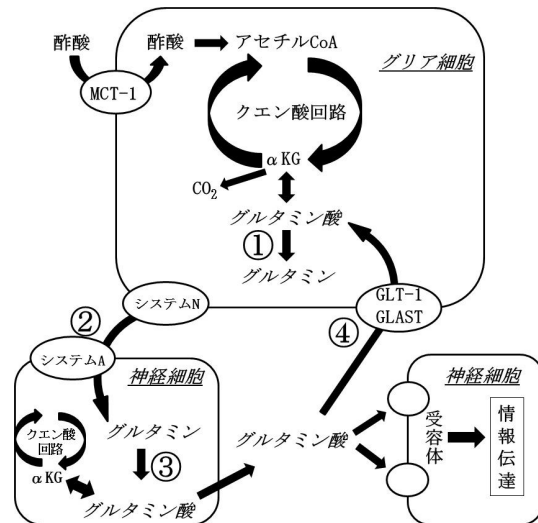


図 1. クエン酸回路及び神経細胞とグリア細胞間のグルタミン酸 グルタミン (Glu-Gln) サイクルの概略図 (MCT-1: モノカルボン酸輸送体、KG: ケトグルタル酸、システム N (or A): アミノ酸輸送システム N (or A)、GLT-1: グルタミン酸輸送体 1、GLAST: グルタミン酸 / アスパラギン酸輸送体)

3. 研究の方法

(1) 神経細胞又はグリア細胞破壊モデル動物における検討

雄性 SD ラットの片側脳へ薬剤を注入できるようイソフルラン麻酔下にて頭部にガイドカニューレを装着し、神経細胞破壊モデルを作製するためにキノリン酸 (60 nmol / μ l、1 μ l) を、グリア細胞破壊モデルを作製するために アミノアジピン酸 (100 nmol / μ l、5 μ l) を片側脳へ微量注入した。

脳内微量注入から数日経過後にラット尾静脈より ¹⁴C 標識酢酸を投与し、5 分後の脳内への ¹⁴C 標識酢酸の取り込み量をオートラジオグラフィ法 (20 μ m 厚の脳切片を作製し、本切片をイメージングプレートに一定期間コンタクトすることによって脳内放射能分布画像を得る手法) にて測定した。

(2) Glu-Gln サイクルの一部過程を阻害した場合における検討

雄性 SD ラットの片側脳へ薬剤を注入できるようイソフルラン麻酔下にて頭部にガイドカニューレを装着する手術を行った。

ガイドカニューレ装着術から数日後、Glu-Gln サイクルの一部過程を阻害する薬剤を片側脳へ 2 μ l 微量注入し、各薬剤の至適時間後にラット尾静脈より ¹⁴C 標識酢酸を投与し、5 分後の脳内への ¹⁴C 標識酢酸の取り込み量をオートラジオグラフィ法にて測定

した。

図1の のグリア細胞内のグルタミン合成酵素を阻害するためには L-メチオニンシルホキシミン (MSOX、15 nmol/μl) を、図1の の神経細胞へのグルタミンの取り込みを阻害するためには - (メチルアミノ) イソ酪酸 (MeAIB、250 nmol/μl) を、図1の の神経細胞内のグルタミン酸合成酵素を阻害するためには 6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン (DON、5 nmol/μl) を、図1の のグリア細胞へのグルタミン酸の取り込みを阻害するためにはジヒドロカイニン酸 (DHK、10 nmol/μl) を使用した。

上記(1)及び(2)の動物実験は大阪大学医学系研究科保健学専攻動物実験委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) 神経細胞又はグリア細胞破壊モデル動物における検討

キノリン酸の脳内注入から2日後(神経細胞破壊時)と7日後(神経細胞破壊後に生じるグリア細胞活性化状態時)における ¹⁴C 標識酢酸の取り込み(5分値)の代表的な脳内分布画像を図2(上段)に示す。

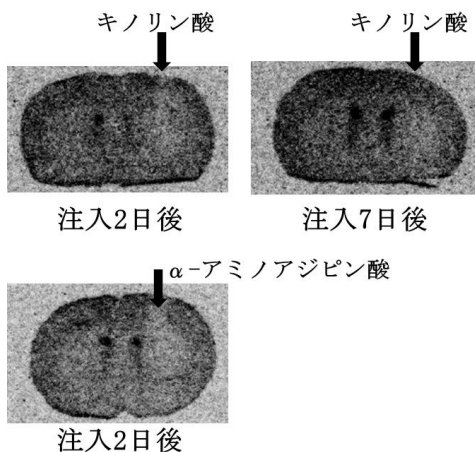


図2.キノリン酸及び α-アミノアジピン酸注入後における代表的な ¹⁴C 標識酢酸の脳内分布画像

神経細胞破壊時及びその後のグリア細胞活性化時の両病態下においてキノリン酸注入部位における ¹⁴C 標識酢酸の取り込みが対照側に比べて約30%低下した。キノリン酸と同じ興奮性アミノ酸であるイボテン酸ラット脳へ注入してから7日経過後の局所脳血流量に変化を認めなかったとの報告 (Frey KA and Agranoff BW, 1983, Science, 219, 879-881) より、今回のキノリン酸注入7日後に観測された ¹⁴C 標識酢酸の取り込み量の低下に局所脳血流量の影響は少ないと考えられる。一方、キノリン酸注入2日後における局所脳血流量は今回検討できなかったため、今後の検討事項ではあるが、興奮性アミノ酸(NMDA やカイ

ニン酸)の脳内注入により引き起こされる血液 脳関門の破綻が注入12時間経過後には回復しているとの報告 (Bolton SJ and Perry VH, 1998, Exp Neurol, 154, 231-240) があることより局所脳血流量も2日後には回復している可能性がある。

また、選択的にグリア細胞を一過性に破壊すると報告されている α-アミノアジピン酸の脳内注入から2日後における ¹⁴C 標識酢酸の取り込み(5分値)の代表的な脳内分布画像を図2(下段)に示す。α-アミノアジピン酸の注入により対照側に比べ ¹⁴C 標識酢酸の取り込みが約20%低下した。本取り込み量の低下が局所脳血流量の低下による影響であるか否かを検討するために、^{99m}Tc 標識ヘキサメチルプロピレンアミンオキシム (HMPAO) を用いて α-アミノアジピン酸注入時の局所脳血流量を検討した。その結果、α-アミノアジピン酸注入部位における ^{99m}Tc 標識 HMPAO の集積が対照側に比べ約27%低下していたため、¹⁴C 標識酢酸の取り込み低下は局所脳血流量の低下が大きく関与していると考えられた。

さらに、酢酸とは別のエネルギー基質である糖のエネルギー代謝についても ¹⁴C 標識デオキシグルコース(糖代謝の指標となる)を用いて検討した。キノリン酸による神経細胞破壊時及びその後のグリア細胞活性化時、及び α-アミノアジピン酸の注入時のどの病態においても糖の取り込み量の低下(対照側に比べ27~58%程度低下)を認めた。

以上の結果より神経細胞及びグリア細胞を破壊した病態においては酢酸及び糖の取り込み量が低下することが判明した。

(2) Glu-Gln サイクルの一部過程を阻害した場合における検討

Glu-Gln サイクルの一部過程を阻害した場合の ¹⁴C 標識酢酸の取り込み(5分値)の代表的な脳内分布画像を図3に示す。

MSOX 及び DHK を注入することにより、対照側に比べて ¹⁴C 標識酢酸の取り込みがそれぞれ15%、18%程度有意に低下していた。一方、MeAIB 及び DON の注入では対照側に比べ有意な変化を認めなかった。

MSOX 及び DHK の注入による ¹⁴C 標識酢酸の取り込み量の低下が局所脳血流量による影響であるか否かを検討するために、^{99m}Tc 標識 HMPAO を用いてそれぞれの薬剤注入時の局所脳血流量を検討した。その結果(図4) MSOX 注入部位において局所脳血流量は対照側に比べ約21%低下し、DHK 注入部位では対照側の約1.5倍に増加していた。本局所脳血流量の測定結果より、MSOX 注入により認められた ¹⁴C 標識酢酸の集積低下は局所脳血流量の低下による影響が大きいと推測された。また、DHK 注入により局所脳血流量が増加していたにも関わらず ¹⁴C 標識酢酸の取り込みが低下していたことから、グリア細胞へのグルタミン酸の取り込み過程の障害が ¹⁴C 標識酢酸の

取り込みの抑制に關与していると考えられた。

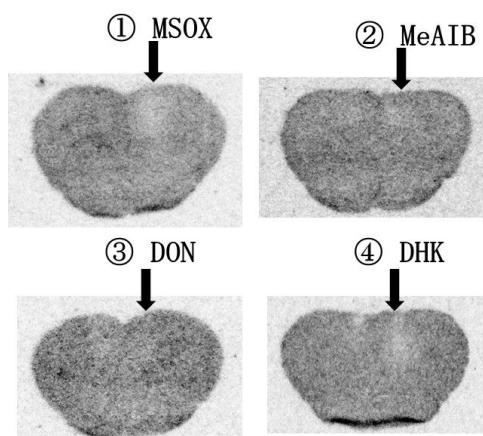


図3 . Glu-Gln サイクルの一部過程を阻害時における代表的な ^{14}C 標識酢酸の脳内分布画像

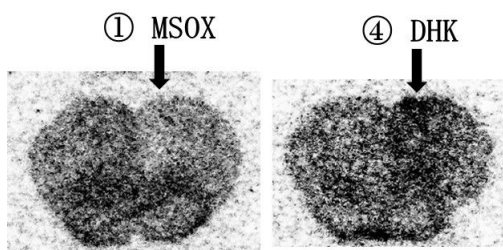


図4 .MSOX 及び DHK を注入した場合における代表的な $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識 HMPAO の脳内分布画像 (局所脳血流画像)

さらに、MSOX 及び DHK については ^{14}C 標識デオキシグルコースを用いて糖の取り込み量を予備的に検討した結果、MSOX 注入では糖の取り込みが低下し、DHK 注入では増加する現象を認めた。しかし、今回認められた糖の取り込み量の増減も局所脳血流量の変化による影響を受けると考えられるため、糖の取り込み量がどの程度真に増減しているのかどうかについては今後詳細な検討をする必要がある。

以上の研究結果より、 ^{14}C 標識酢酸の取り込みはクエン酸回路の活性状態のみならず、グリア細胞へのグルタミン酸の取り込み過程にも影響を受けている可能性が示唆されたことより、グルタミン酸の取り込み過程における機能異常の指標としても ^{14}C 標識酢酸が利用できる可能性があると考えられた。今後、グリア細胞へのグルタミン酸の取り込み過程がどのような機序で標識酢酸の取り込みを調整しているかについてさらなる検討を行う必要がある。

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)

[学会発表](計1件)

柳本 和彦、細井 理恵、本行 忠志、ラット脳内グルタミン酸 - グルタミンサイクルの機能異常と ^{14}C 標識酢酸の集積の変化に関する検討、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 26 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柳本 和彦 (YANAMOTO, Kazuhiko)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70531531