

平成21年 4月26日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570058

研究課題名（和文）

内耳血管条における糖輸送システムの解明～機能的上皮組織構築と膜輸送体の連携

研究課題名（英文）

Glucose transport mechanism in the cochlea stria vascularis

研究代表者

安藤 元紀（ANDO MOTONORI）

岡山大学・大学院教育学研究科・准教授

研究者番号：20222789

研究成果の概要：

内耳血管条機能の根幹を支える糖輸送機構を明らかにする目的で、それに関わる糖輸送分子の組織特異的な遺伝子発現およびタンパク質発現を明らかにした。その結果、糖輸送体分子の一つであるGLUT-1型が血管条構成細胞の中で基底細胞と血管構成細胞に発現していることや、新たに複数のGLUT型の輸送体の遺伝子発現を確認した。血管条では複数の促進拡散型糖輸送体が連携してその高いエネルギー代謝活性を支えているものと考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造（5704）

キーワード：組織構築，辺縁細胞，基底細胞，グルコーストランスポーター，RT-PCR，共焦点レーザー顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

内耳血管条は内リンパ直流電位の生成および内リンパ産生に関わる重要な組織で、その機能異常は直ちに難聴をひきおこす。本研究代表者はこれまでに、血管条機能を明らかにする目的で、その構成細胞どうしの連携に着目した一連の細胞生理学的研究を行ってきた。その結果、「血管条のエネルギー代謝システムはそのユニークな組織構築と密接に関係し

ている」という結論に達した。

エネルギー代謝の根幹を担う細胞膜糖輸送体として、一般には、促進拡散型のグルコース単輸送体（GLUT）と細胞内外のNa<sup>+</sup>の電気化学的勾配により駆動されるNa<sup>+</sup>/グルコース共輸送体（SGLT）が知られている。研究代表者らは、血管条の単離辺縁細胞の生理学的実験から、この細胞の主なグルコース取り込み機構はGLUT型であることを既に報告している。

## 2. 研究の目的

内耳血管条におけるエネルギー供給システムの重要性にも関わらず、血管条に発現しているhexoseおよびpolyol輸送体の網羅的な研究はこれまでに皆無であった。本研究課題の目的を以下に示す。

- (1) 血管条における糖輸送体(GLUT1)の遺伝子発現解析。
- (2) 免疫組織化学法による血管条におけるGLUT1の局在解析。
- (3) 抗GLUT1抗体による基底細胞および血管系の立体構造の解析。
- (4) 単離血管条構成細胞を用いたGLUT1の局在解析。
- (5) 辺縁細胞のGLUTの分布と血管系・基底細胞との構造的連携の検討。

## 3. 研究の方法

- (1) 血管条の全層標本からmRNAを抽出し、GLUTファミリーを構成するアイソフォームの発現プロファイルをRT-PCR法により解析する。
- (2) 血管条の全層標本の間接蛍光抗体法による免疫染色を行う。抗体は抗GLUT1抗体と中間細胞特異的な抗Kir4.1抗体を用いる。共焦点レーザー顕微鏡により高次構造の観察をおこなう。
- (3) 血管条の全層標本を抗GLUT1抗体で免疫染色し共焦点レーザー顕微鏡により3次元構築をおこなうことによって、基底細胞の3次元分布を調べる。
- (4) 摘出した血管条をトリプシン処理した後、低融点アガロース内での機械的操作により、必要な血管条構成細胞の単離細胞を得る。陰性コントロールとして抗ペプチド抗体に対する抗原ペプチドによる吸収試験を行う。細胞の同定は形態学的特徴に従う。
- (5) 辺縁細胞において新しいGLUTのアイソフォームが判明した場合、血管条における微小

循環系(毛細血管網)と新たなGLUTの発現との構造的な連関を調べるために、これまでに開発した蛍光ゼラチン法と免疫染色との併用による3次元組織構築をおこない検討する。

## 4. 研究成果

(1) ラット・スナネズミ・モルモットを用いてGLUT1の局在を検討した。RT-PCR法により血管条においてGLUT1のmRNAの発現が確認された。血管条の全層標本の間接蛍光抗体法による免疫染色を行った。抗体は抗GLUT1抗体と中間細胞特異的な抗Kir4.1抗体を用いた。ラットについては基底細胞にGLUT1の強い陽性シグナルが観察され、中間細胞に発現しているKir4.1のシグナルとはその局在が重複していなかった(図1)。辺縁細胞は両抗体に対して陰性であった。モルモットの中間細胞におけるGLUT1の発現については結論を得られなかった。

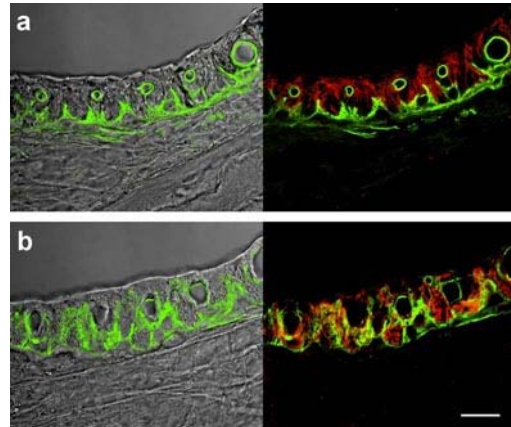


図1. 血管条におけるGLUT1陽性部位。ラット(a)、モルモット(b)。抗GLUT1抗体陽性部位(緑)。抗Kir4.1陽性部位(赤)。

(2) 単離血管条細胞を用いたGLUT1の局在解析をおこなった。摘出した血管条をトリプシン処理した後、低融点アガロース内での機械的操作により、必要な血管条単離細胞を得た。これまでGLUT1発現の報告があったモルモットについて調べたところ、GLUT1に陽性な細胞は基底細胞と血管構成細胞であり、辺縁細胞

については陰性であることがわかった(図2)。

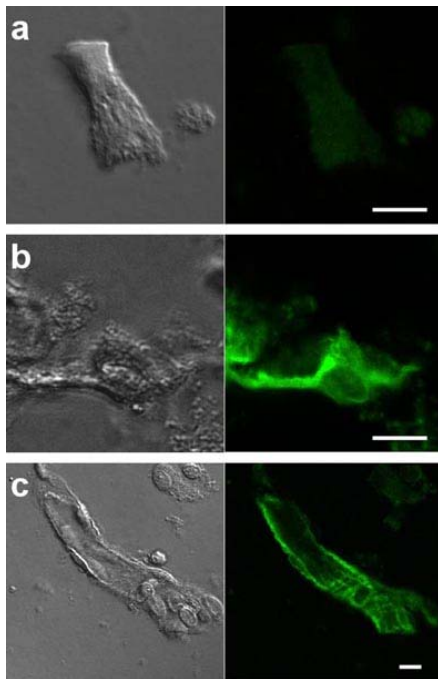


図2. 単離血管条細胞における GLUT1 陽性部位 (モルモット)。辺縁細胞(a), 基底細胞(b), 血管構成細胞(c)。抗 GLUT1 抗体陽性部位(緑)。

(3)共焦点レーザー顕微鏡により, 抗 GLUT1 抗体陽性部位の立体構造の解析を行った。基底細胞・血管内皮細胞が抗 GLUT1 抗体に対して陽性であった。3次元解析により, 基底細胞から周期的に辺縁細胞に向かって突起が伸びていることが初めて確認された。

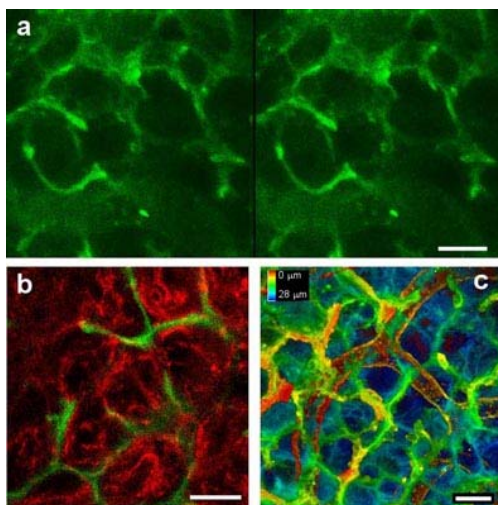


図3. 血管条全層標本における GLUT1 陽性部

位の3次元構造。抗 GLUT1 抗体陽性部位(緑)。抗 Kir4.1 陽性部位(赤)。基底細胞からの突起が辺縁細胞方向に向かって伸びているのがわかる。

これまでの報告から, 基底細胞どうしはタイトジャンクションにより結合しており, 基底細胞層自体が外リンパからの物質の透過を制限していると考えられている。今回の結果から, 血管条内へのグルコースの流入経路として基底細胞層に発現している GLUT1 がその主要な役割を果たしていることが示唆された。

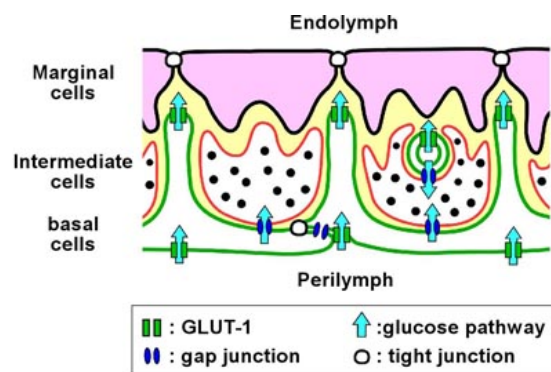


図4. 血管条におけるグルコース輸送経路の模式図。基底細胞層および血管を經由して, グルコースが辺縁細胞に向かって輸送されている様子を示す。

(5)これまでに GLUT family を構成する分子として13のアイソフォーム, SGLT family を構成する分子として4つのアイソフォームが報告されている。それぞれの塩基配列に従い特異的なプライマーをデザインし, 血管条標本における mRNA サンプルから RT-PCR を行ったところ, GLUT family については GLUT1 以外に6つのアイソタイプの発現が確認され, SGLT についてはその発現が確認されなかった。発現が確認された GLUT タイプの6つのアイソタイプのうち2つは GLUT1 と同程度の発現量を示し, 他の4つはその発現量が比較的少なかった。まず発現が確認された GLUT4 について抗ペプチド抗体を用いて免疫染色

をおこなったところ、その陽性シグナルは基底細胞層に局限していた。ただし、GLUT1が基底細胞と血管に局在していたのに対して、GLUT4は血管に対しては陰性であった。また、GLUT1は基底細胞の細胞膜に局在していたのに対して、GLUT4は細胞質にその陽性シグナルが局在しているように観察された。

(6)本研究により、内耳血管条においてこれまで報告のなかった糖輸送体として新たに複数の GLUT アイソフォームの発現を確認した。一つの組織の中で GLUT1 を含めて複数の GLUT アイソフォームが機能していることになり、それぞれのアイソタイプの局在を明らかにしていく必要がある。また、本研究でその発現が確認されたいくつかの糖輸送体はインシュリンをはじめとしてなんらかの調節物質依存性を有していることから、内耳組織全体における糖輸送に関わる生理的調節の仕組みを明らかにする試みが今後必要となる。

## 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 3 件)

①Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Handa T, Yamasaki F, Sato T. Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 137:223-231, 2009, 査読有り。

②Ando M, Edamatsu M, Fukuizumi S, Takeuchi S. Cellular localization of facilitated glucose transporter 1 (GLUT-1) in the

cochlea stria vascularis: its possible contribution to the transcellular glucose pathway, *Cell Tissue Res*, 331:763-769, 2008, 査読有り。

③Kuwabara M, Kakinuma Y, Katare RG, Ando M, Yamasaki F, Doi Y, Sato T. Granulocyte colony-stimulating factor activates Wnt signal to sustain gap junction function through recruitment of beta-catenin and cadherin. *FEBS Lett*, 581:4821-4830, 2007, 査読有り。

[学会発表] (計 2 件)

①Edamatsu M, Enomoto T, Fukuizumi S, Ando M. Cell-specific expression of glucose transporter in the cochlear stria vascularis, 第 79 回日本動物学会大会, 2008. 9. 5, @Fukuoka.

②Edamatsu M, Fukuizumi S, Ando M. Glucose transport mechanism in the cochlear stria vascularis, 第 78 回日本動物学会大会, 要旨集, 2007. 9. 20, @Hirosaki.

[その他]

研究成果および学会発表の情報について、自身のホームページのデータベースに追加し、公表している。

[http://ed-www.ed.okayama-u.ac.jp/~rika/cell\\_physiology/index.html](http://ed-www.ed.okayama-u.ac.jp/~rika/cell_physiology/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安藤 元紀 (ANDO MOTONORI)

岡山大学・大学院教育学研究科・准教授

研究者番号：20222789

### (2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし