

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463163

研究課題名(和文) 発達期の摂食機能獲得に関与する機能分子の組織学的研究

研究課題名(英文) Histological study of functional molecules involved in acquirement of developmental function for eating

研究代表者

高崎 千尋 (TAKASAKI, Chihiro)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60451449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：モノカルボン酸トランスポーターという炭水化物や脂肪、アミノ酸の代謝に不可欠な運び屋の役割を果たすタンパクのMCT1に着目し、それがマウス脳の摂食に関連する領域でどのような細胞発現を示すのかを解析した。その結果、MCT1は転写レベルではニューロンの他、アストロサイトや血管内皮細胞に発現したが、後転写レベルではニューロンには発現せず、アストロサイトと血管内皮細胞に発現した。このことから、MCT1のニューロン発現は転写レベルでは活性化され、後転写レベルでは抑制されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rapid transport of monocarboxylates is essential for carbohydrate, fat, and amino acid metabolisms. The transport is facilitated by proton-linked monocarboxylate transporters (MCTs). MCT1, MCT2 and MCT4 are highly expressed in the brain. In the present study, we examined cellular expression of MCT1 in the mouse brain by fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry. The results showed that dissociated transcription and translational control in neurons was found in pyramidal cells in the CA1 of hippocampus and cholinergic neurons in the dorsal motor nucleus of vagus nerve. Therefore, neuronal expression of MCT1 is transcriptionally active, but suppressed at the post-transcription levels. Through this mechanism, predominant MCT1 expression in astrocytes and capillary endothelial cells is constructed in the brain.

研究分野：小児歯科

キーワード：摂食 マウス

1. 研究開始当初の背景

摂食は生命維持に必要な栄養素を摂取する行為であり、その機能は生きる上で重要である。摂食機能に障害をもつ人は、発達障害児、高齢者など少なくない。歯科界において摂食機能発達を解明することは重要な課題であるが、分子レベルでは未だ明らかにされていない点も多い。

今回、我々はモノカルボン酸トランスポーター (MCT) に着目した。モノカルボン酸には、乳酸、ピルビン酸、ケトン体等が含まれる。モノカルボン酸の素早い輸送は、炭水化物、脂肪、アミノ酸代謝に不可欠である。その輸送は、H⁺依存性の MCT によって促進される。MCT のサブタイプは 14 種類同定され、そのうち、MCT1、MCT2、MCT4 は脳で発現することが報告されている (Andrew P. Halestrap and Marieangela C. Wilson, 2012)。また、MCT1 は胃から肛門まで幅広く消化管に発現し、特に大腸で強い発現を示す。一方、MCT2 は胃粘膜に限局し、MCT1、MCT2 ともに上皮細胞の側基底面に発現する (Iwanaga et al., 2006)。さらに、MCT2 mRNA は 4 8 時間の絶食後、ラット脳の最後野-孤束核領域で有意に増加することが報告されている (Matsuyama et al., 2009)。高脂肪食を与えたマウスでは、標準食を与えたマウスと比較して、MCT1、MCT2、MCT4 の発現が特に脳の皮質や海馬で増加したという報告もある (Pierre et al., 2007)。しかし、摂食と関連する脳領域で MCT がどのような発現や局在を示すのか詳細は未だ明らかにされていない点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、摂食と関連するマウスの脳領域 (特に海馬と脳幹の摂食関連領域) で MCT1 の細胞発現を *in situ* hybridization と免疫組織化学を用いて明らかにし、摂食機能に重要な分子の機能的な役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物と切片前処理

C57BL マウス生後 10 日 (P10) と成体 (生後 1.5~2 か月齢) を用いた。動物の取り扱いには「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に準じた。ペントバルビタールで十分麻酔を行った後、4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝溶液で経心的灌流固定を行った。抜脳後、マイクロスライサー (VT1000S、ライカ社) にて 40 μm の切片を、あるいは 30%スクロースで後固定した後、クリオスタット (CM1900、ライカ社) にて 30 μm の切片を作製した。Fluorescent *in situ* hybridization のために、十分麻酔を施した後、抜脳し、ドライアイスにて急速凍結後、

クリオスタットにて 30 μm の切片を作製した。

(2) 抗体

抗 MCT1 抗体:(ウサギ/モルモット, Kaji et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 308:G188-197, 2015)、抗 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素 (Phgdh) 抗体:(ウサギ/モルモット, Yamasaki et al., JNS, 21:7691-7604, 2001)、抗グルタミン酸アスパラギン酸トランスポーター (GLAST) 抗体(ウサギ/モルモット/ヤギ, Shibata et al., JNS, 17:9212-9219, 1997)、抗微小管関連タンパク-2 (MAP2) 抗体:(ヤギ, Miura et al., JNC, 21:7691-7704, 2006)、抗グルコーストランスポーター-1 (Glut1) 抗体:(モルモット, Sakai et al., JNS, 23:550-560, 2003)を用いた。

(3) mRNA 用のジゴキシゲニン (DIG)- あるいはフルオレセイン- 標識 cRNA プローブ

MCT1 (マウス, 194-1690 bp ; GenBank accession number NM_009196)、小胞型グルタミン酸トランスポーター 1 型 (VGluT1) (マウス, 301-1680; BC054462)、小胞型グルタミン酸トランスポーター 2 型 (VGluT2) (マウス, 934-2060; BC038375)、67 kDa-GABA 合成酵素 (GAD67) (マウス, 1036-2015; NM_008077)、血管内皮成長因子受容体-1 (VEGFR1) (マウス, 3481-4258; NM_010228)、グルタミン酸アスパラギン酸トランスポーター (GLAST) (マウス, 1620-2576; BC066154.1)、コリントランスポーター (CHT) (マウス, 1-1743(510-2252); NM_022025) を使用した。

(4) 免疫組織化学

全ての免疫反応は室温 (25) で行った。正常 10%口バ血清によるブロッキング後、一次抗体と一晚反応させ、Alexa488-、Cy3-、Cy5- を標識した種特異的な二次抗体で 2 時間反応させた。蛍光像は、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, オリンパス、あるいは FV1200, オリンパス) を用いて画像化した。

(5) Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

通法に従い、行った (Takasaki et al., EJN, 32, 1326-1336, 2010)。

(6) Chromogenic *in situ* hybridization

通法に従い、行った。

4. 研究成果

(1) 脳における MCT1 mRNA 発現

はじめに *in situ* hybridization を用いてマウス成体脳における MCT1 mRNA の発現を調べた。Chromogenic *in situ* hybridization の結果を図 1 に示す。MCT1 mRNA シグナルは

脳全体に広く分布し、特に海馬や小脳において豊富であった(図1A,C)。脳幹部では、最後野(AP)、迷走神経背側運動核(DMN)にMCT1 mRNAの強いシグナルが認められた(図1D,E)。

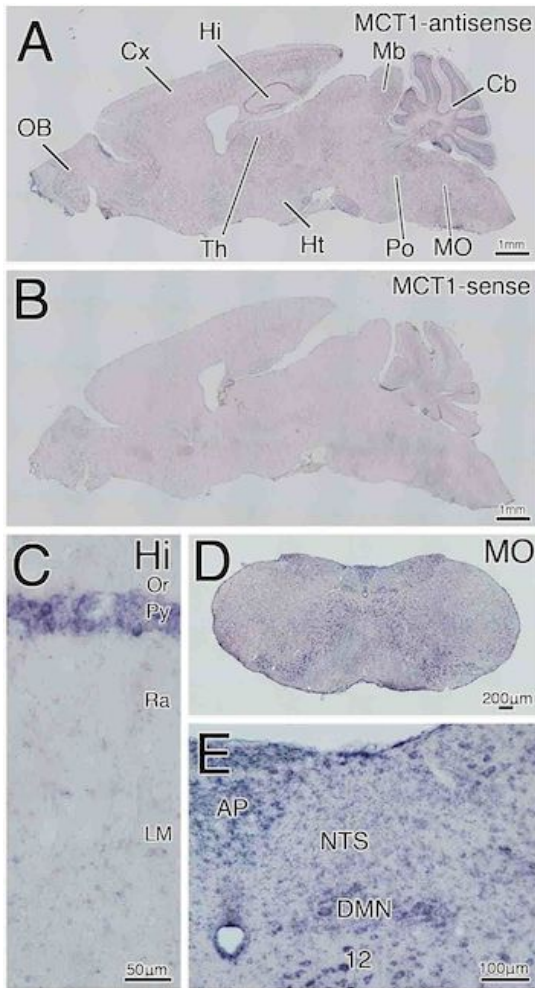


図1 MCT1 mRNA の発現

OB:嗅球, Cb:小脳, Cx:大脳皮質, Hi:海馬, Mb:中脳, MO:延髄, Po:橋, Th:視床, Ht:視床下部, Or:上昇層, Py:錐体細胞層, Ra:放線状層, LM:網状分子層, AP:最後野, NTS:孤束核, DMN:迷走神経背側運動核, 12:舌下神経核

(2) 海馬における MCT1 mRNA 発現

次に MCT1 mRNA の発現が豊富だった海馬において、MCT1 mRNA を発現する細胞の神経化学的な特性を、Fluorescent *in situ* hybridization(FISH)により解析した(図2)。

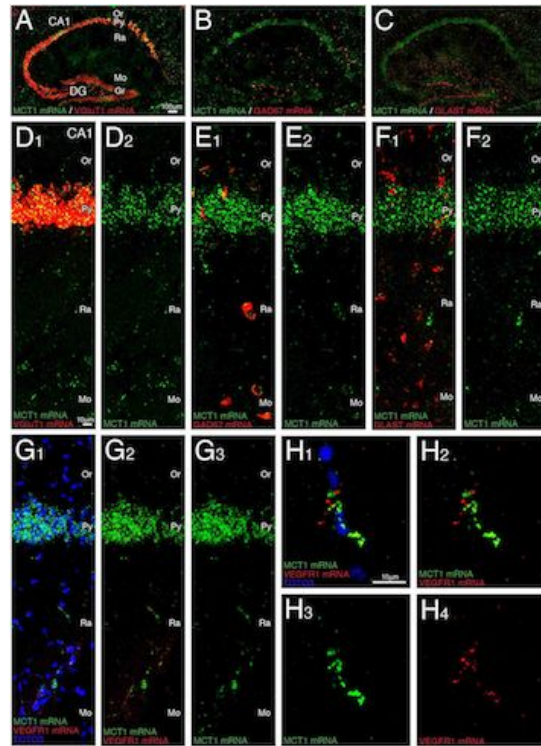


図2 海馬における MCT1 mRNA シグナル

Or:上昇層, Py:錐体細胞層, Ra:放線状層, Mo:分子層, Gr:顆粒細胞層, DG:歯状回

成体の海馬 CA1 領域において、小胞型グルタミン酸トランスポーター 1 型 (VGLUT1) mRNA を発現している錐体細胞に、強い MCT1 mRNA シグナルが認められた(図2A,D)。MCT1 mRNA の低い発現は 67kDa-GABA 合成酵素 (GAD67) mRNA を発現する GABA 作動性介在ニューロン(図2B,E)や、グルタミン酸アスパラギン酸トランスポーター-GLAST を発現するアストロサイト(図2C,F)や血管内皮成長因子受容体-1(VEGFR1) mRNA を発現する血管内皮細胞(図2G,H)にみられた。よって、MCT1 mRNA シグナルはニューロン、アストロサイト、血管内皮細胞で検出された。

(3) 海馬における MCT1 の細胞発現

海馬 CA1 領域における MCT1 のタンパクレベルでの発現を蛍光免疫組織化学により解析した(図3)。

MCT1 免疫反応は 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素 (Phgdh) を発現するアストロサイト(図3B,C)やグルコーストランスポーター 1 (Glut1) を発現する血管内皮細胞(図3D,E)において陽性を示した。一方、微小管関連タンパク-2(MAP2) を発現する錐体細胞の樹状突起や細胞体では陰性を示した(図3B1)。よってタンパクレベルで MCT1 はアストロサイトや血管内皮細胞に発現するが、ニューロンには発現しないことが判明した。

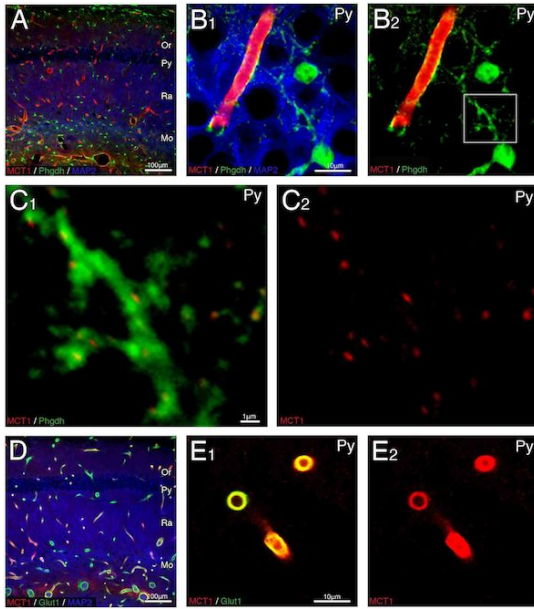


図3 海馬における MCT1 発現

(4) 脳幹における MCT1 mRNA 発現

成体の脳幹摂食関連領域での MCT1 mRNA の発現を FISH により解析した(図4)。

迷走神経背側運動核(DMN)のコリントランスポーターCHT mRNA を発現するコリン作動性ニューロンにおいて MCT1 mRNA の強いシグナルがみられた(図4A,B)。低い発現は GLAST mRNA を発現するアストロサイト(図4C)や VEGFR1 mRNA を発現する血管内皮細胞(図4D)にみられた。

よって、脳幹の迷走神経背側運動核(DMN)において MCT1 mRNA がニューロンに高発現し、アストロサイトや血管内皮細胞にも発現することが示された。

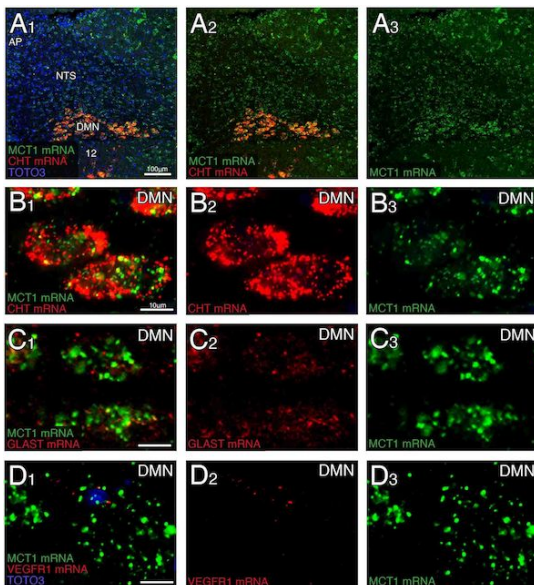


図4 脳幹における MCT1 mRNA シグナル

(5) 脳幹における MCT1 の細胞発現

成体の脳幹摂食関連領域での MCT1 のタンパクレベルでの発現を蛍光免疫組織化学により解析した(図5)。

脳幹の迷走神経背側運動核(DMN)において、MCT1 免疫反応はグルタミン酸アスパラギン酸トランスポーターGLAST を発現するアストロサイト(図5A,B)とグルコーストランスポーターGlut1 を発現する血管内皮細胞(図5C)において陽性を示したが、微小管関連タンパク-2 (MAP2)を発現するニューロンの樹状突起や細胞体では陰性を示した(図5B)。最後野(AP)においても同様の反応がみられた。よって、脳幹の摂食関連領域においても MCT1 はタンパクレベルでアストロサイトや血管内皮細胞に発現するが、ニューロンには発現しなかった。

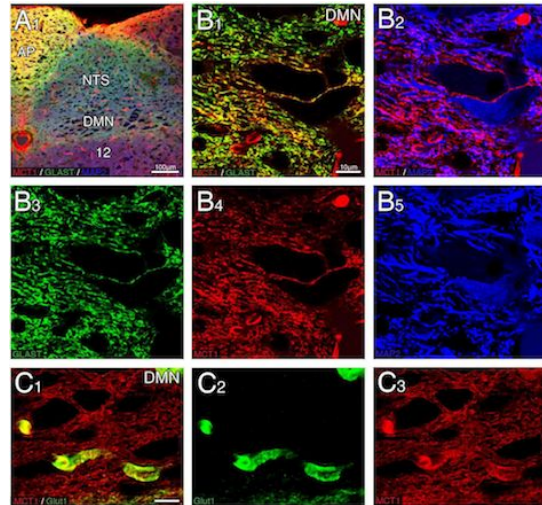


図5 脳幹における MCT1 発現

(6) 発達期における MCT1 の発現

発達期の生後10日(P10)において、脳幹の摂食関連領域で成体と同様に FISH と蛍光免疫組織化学により MCT1 の発現解析を行った。

FISH による解析を図6示す。VEGFR1 mRNA を発現する血管内皮細胞に P10 では成体よりも強い MCT1 mRNA シグナルを認めた(図6D)。成体と同様に CHT mRNA を発現するコリン作動性ニューロン(図6A,B)と GLAST mRNA を発現する一部のアストロサイトにも MCT1 mRNA シグナルが認められた(図6C)。

蛍光免疫組織化学により MCT1 のタンパクレベルでの発現も解析したが、成体と同様にニューロンには発現せず、アストロサイトや血管内皮細胞において MCT1 陽性反応が認められた。

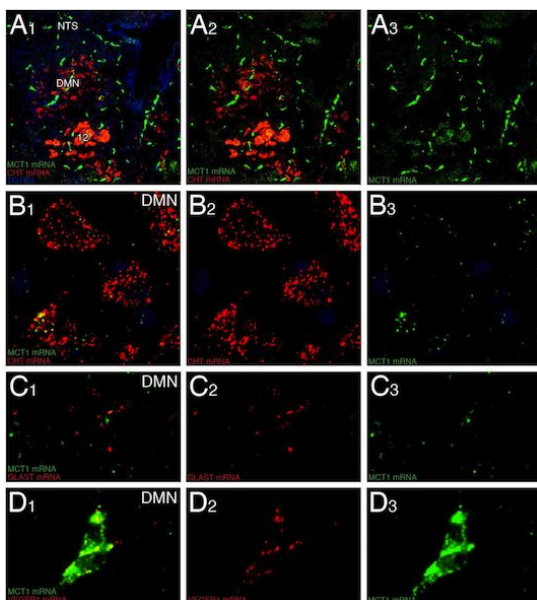


図6 発達期の脳幹における MCT1 mRNA シグナル

以上のことから、MCT1 は mRNA レベルで海馬 CA1 領域の錐体細胞と脳幹の迷走神経背側運動核でニューロン発現を認めたが、タンパクレベルではニューロンには発現せず、mRNA レベルとタンパクレベルでは発現が乖離することが判明した。したがって、MCT1 のニューロン発現は転写レベルで活性化されるが、後転写レベルでは抑制される。このメカニズムにより、アストロサイトや血管内皮細胞の優位な MCT1 発現が脳を構成して、摂食の調節を含めたエネルギー代謝を円滑に行うことが示唆された。

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1件)

Miwako Yamasaki, Rieko Okada, Chihiro Takasaki, Shima Toki, Masahiro Fukaya, Rie Natsume, Kenji Sakimura, Masayoshi Mishina, Tetsuo Shirakawa, Masahiko Watanabe : Opposing role of NMDA receptor GluN2B and GluN2D in somatosensory development and maturation.

Journal of Neuroscience, 査読有, 34(35):11534-11548, 2014.

doi:10.1523/JNEUROSCI.1811-14.2014.

[学会発表](計4件)

Chihiro Takasaki, Koutarou Konno, Masahiko Watanabe : Distinct post-transcriptional regulation of monocarboxylate transporter 1 expression between neurons and non-neuronal cells in the adult mouse brain.

Proceedings of the 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, March 21-23, 2015, Kobe Convention Center, Kobe, Hyogo, Japan.

Miwako Yamasaki, Rieko Okada, Chihiro Takasaki, Shima Toki, Masahiro Fukaya, Rie Natsume, Kenji Sakimura, Masayoshi Mishina, Tetsuo Shirakawa, Masahiko Watanabe : Opposing role of NMDA receptor GluN2B and GluN2D in somatosensory development and maturation.

Proceedings of the 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, March 21-23, 2015, Kobe Convention Center, Kobe, Hyogo, Japan.

Chihiro Takasaki, Yasutaka Yawaka : Distinct post-transcriptional regulation of monocarboxylate transporter 1 expression between neurons and non-neuronal cells in the mouse brain. 25th Congress of the International Association of Paediatric Dentistry, Jul 1-4, 2015, Scottish Exhibition and Conference Centre, Glasgow, UK.

高崎千尋, 八若保孝: Megacystis microcolon intestinal hypoperistalsis syndrome(MMIHS)患者の歯科的所見.

第32回日本障害者歯科学会学術大会, 2015年11月6~8日, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高崎 千尋 (TAKASAKI, Chihiro)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 60451449

(2)研究分担者

内ヶ島 基政 (UCHIGASHIMA, Motokazu)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 10614662

(3)研究連携者

渡辺 雅彦 (WATANABE, Masahiko)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70210945