

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570064

研究課題名（和文）

聴覚機能の根幹を支える内耳蝸牛血管条のエネルギー供給システムの全貌

研究課題名（英文）

Glucose transport pathways in the cochlear 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・教授

研究者番号：20222789

研究成果の概要（和文）：内耳蝸牛血管条の糖輸送システムを明らかにするために、促進拡散型糖輸送体（GLUT型）遺伝子ファミリーについて網羅的な解析を行った。蝸牛管側壁において8つのGLUT遺伝子アイソフォームの発現が確認された。発現量の多かったGLUT1, -4, -10, -13 (HMIT)のタンパク質の局在を調べたところ、GLUT1, -4, -10は基底細胞に発現していることが分かった。血管条におけるグルコース輸送経路として、基底細胞を介する外リンパからの流入経路が予想された。また、HMITは辺縁細胞にその強い陽性シグナルが認められ、イノシトールリン脂質の代謝、pHおよび浸透圧調節への関与が示唆された。複数の糖輸送体が内耳液性制御機構に重要な役割を果たしていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The present study provides the first evidence that mRNAs of eight GLUT isoforms are expressed in the stria vascularis and the spiral ligament. These GLUT isoforms are suspected to involve in the high metabolic activity of the stria vascularis, and to play specific roles in maintenance of cochlear glucose homeostasis. Among these isoforms, GLUT1, -4 and -10 proteins were expressed in the strial basal cells. These findings validate the transcellular glucose pathway from perilymph to intrastrial space via the basal cell layer. We also demonstrated that GLUT13 (HMIT) was expressed in the strial marginal cells, and speculate that HMIT in the marginal cells may be involved in PI synthesis, osmoregulation, and pH homeostasis of cochlear fluids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

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

キーワード：辺縁細胞, 基底細胞, グルコーストランスポーター, GLUT, SGLT, HMIT

1. 研究開始当初の背景

内耳蝸牛血管条は、辺縁・中間・基底細胞および血管構成細胞からなり、音感受細胞(有毛細胞)が音受容能を発現するためのいわばアンプ(増幅器)の役割を担う。血管条の機

能不全は直ちに難聴を引き起こすが、その正常機能を支えるエネルギー供給システム(糖輸送システム)の全貌はいまだ未解明である。研究代表者は、これまでに、科学研究費の助成を受け、血管条構成細胞が虚血に対して極

めて脆弱でありその障害過程が高い代謝活性を示す心筋細胞や脳神経細胞の虚血による細胞障害（アポトーシス）の様相と類似していることを報告し（Ando et al, 2002），内耳糖輸送システムの言わば入り口の関門に相当するグルコース輸送体分子（GLUT-1）の組織内局在を明らかにした（Ando et al, 2008）。基底細胞の3次元空間配置が内耳糖輸送経路に重要な役割を果たしていることを証明した。内耳機能を維持するエネルギー供給システムの本態に迫りつつある。

内耳血管条は、エネルギーを大量に消費しながら活発なイオン輸送を行い、内リンパ直流電位（+80 mV）の生成および内リンパ産生（150 mM K⁺）に中心的な役割を果たしている。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、「血管条の生理機能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。以下に、本研究課題立案に至った経緯を示す。

(1) 内耳蝸牛血管条機能と微小循環システムの密接な連携

血管条組織は高い代謝活性を示し、それを維持するためにその名の由来にもなった特異な毛細血管網を有する。申請者らのこれまでの研究成果より、この血管網が辺縁細胞を除くその他の血管条構成細胞とギャップ結合で電氣的に連絡していることが判明し、内耳微小循環システムが単純な栄養補給路としての役割だけでなく、内耳特異的な生理機能に直接関与する可能性が明らかとなった。

(2) 血管条辺縁細胞（上皮細胞）に備わっている未知の糖輸送体

血管条辺縁細胞内にはミトコンドリアが高密度で集積し、好氣的エネルギー代謝活動が活発であることを示している。研究代表者ら

は、単離辺縁細胞への紫外線照射により、その細胞質が還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）由来の自家蛍光を発することを見出した。この蛍光強度が細胞外グルコースに依存し、細胞外液中のグルコースの濃度を低下させると、その蛍光強度が急速に減少することが明らかとなった。つまり、辺縁細胞には未知のグルコース輸送体が備わっており、細胞内のグリコーゲンをはじめとするエネルギー源の貯蔵は、その活発な消費に比べて非常に小さいものと推測された。

(3) 辺縁細胞が血流障害に対して脆弱であることの証明

辺縁細胞は、電子顕微鏡的検索によるその細胞質の電子密度の高さから、別称「暗細胞」（dark cell）と呼ばれている。研究代表者は、この辺縁細胞の特徴が、高い代謝活性を示す心筋細胞や脳神経細胞の虚血による細胞障害の様相と類似していることを突き止めた。我々は、循環障害なしに内耳組織に適用できる新しい固定手技を開発し、辺縁細胞の暗細胞化を抑制できることを証明した。わずか3分の虚血により劇的な細胞内変化が誘発されることが判明し、内耳機能は循環障害に対して極めて脆弱であると考えられた。

(4) 血管条組織に発現する糖輸送体

糖輸送体として、促進拡散型のグルコース単輸送体（GLUT）と二次性能動輸送体のNa⁺/グルコース共輸送体が知られている。研究代表者らは生理学的実験から血管条における主なグルコース取り込み機構はGLUT型の可能性が高いことを既に報告している。GLUT型については現在までに13のアイソフォームが報告されている。研究代表者は、血管条にGLUT1が発現していること（Ando et al, 2008）、また予備実験によりさらに6つのGLUT型が発現していることを既に確認している。

以上、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皆無であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、聴覚機能の根幹を支える内耳蝸牛血管条のエネルギー供給システム（糖輸送システム）の全貌を明らかにすることにある。血管条は生体内で最も高い代謝活性を示す上皮組織の一つであるが、そのエネルギー消費を支えている糖輸送システムは未解明である。本研究課題の遂行により、内耳正常機能の解明に加えて、新たな内耳疾患の原因遺伝子の発見にもつながる可能性がある。

研究期間内に、(1) 蝸牛管側壁（血管条とラセン靭帯）に発現する多様な糖輸送体分子をプロファイルし、(2) 各組織間における発現量の差を定量し組織特異的発現遺伝子を同定する。(3) 遺伝子情報に基づいてタンパク質解析を行い、組織内局在を網羅的に解明する。その上で、(4) 内耳エネルギー供給システムの主要経路を推定するとともに、(5) 内耳組織に構築されている特異的な細胞間結合ネットワークによる二次的な輸送経路を解明し、内耳血管条への糖輸送システムの全貌を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 齧歯類（マウス、ラット、スナネズミ）の蝸牛管側壁から血管条とラセン靭帯を別々に単離し、一般的なRT-PCRを行い糖輸送体（受動輸送体および二次性能動輸送体）の遺伝子発現プロファイルを明らかにする。
- (2) 発現が確認された糖輸送体分子について定量PCR（real-time PCR）を行い、組織間における発現量の違いから、血管条に特異的に発現している糖輸送分子を同定する。
- (3) 遺伝子発現が確認された糖輸送体分子のタンパク質の発現とその局在をイムノブロッ

ト法および免疫染色法により明らかにする。

(4) 組織内局在の解析が困難な分子について、単離血管条構成細胞を用いて細胞レベルの局在を明らかにする。

(5) 蛍光グルコース誘導体を用いた糖輸送経路可視化法により、蝸牛管側壁における糖輸送体とギャップ結合の連携を考慮した糖輸送経路の全貌を解明する。

4. 研究成果

(1) 糖輸送体（受動輸送体／二次性能動輸送体）の遺伝子発現プロファイル解析

血管条およびラセン靭帯を含む蝸牛管側壁においてGLUT型のアイソタイプに関しては、現在までにGLUT1の免疫活性が報告されているのみであり、SGLT型については報告が無い。そこで、これまでに13種のアイソフォームが登録されているGLUTファミリーについての遺伝子発現解析を行った。その結果、蝸牛管側壁においてはGLUT-1に加えて7種（計8種）のアイソフォームが発現していることが確認された（図1）。

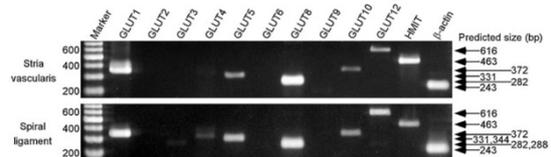


図1. GLUT型遺伝子アイソフォームの発現。

また、これまでに4種のアイソフォームが登録されているSGLT型についてはどのアイソタイプの発現も確認されなかった。上記結果を踏まえて、遺伝子発現が確認されたGLUT型の8種のアイソフォームについてreal-time PCR解析を行った（図2）。その結果、血管条とラセン靭帯において組織依存的にそれらの発現量が異なることが判明した。今後は、遺伝子発現の確認されたアイソタイプのタンパク質発現およびそれらの組織内局在を明らかにす

る必要がある。

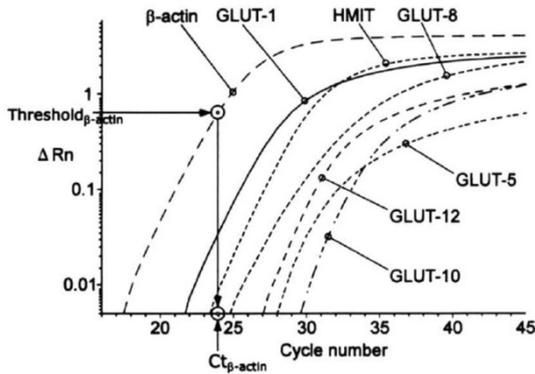


図2. Real-time PCR法による増殖曲線の一例。
 β -actinを実例としてCt値の求め方を示す。

(2) 糖輸送体タンパク質の発現

遺伝子発現が確認された糖輸送体分子について、タンパク質の発現を確認すると同時にその局在を免疫組織化学的に解析した。陽性シグナルが比較的強く認められたGLUT4、-10、-13(HMIT)に着目した。GLUT4、-10については血管条内でその陽性シグナルが確認されたが、同時に成獣だけでなく幼若動物の発達段階に応じた発現量の変化を調べる必要があることが判明した。また、ミオイノシトール輸送体の一つであるHMITについては血管条でその強い陽性シグナルが認められた。単離血管条細胞を利用した免疫組織化学法と血管条全層標本を用いた免疫電子顕微鏡法を併用し、血管条構成細胞ごとの糖輸送体の発現の違いについて解析を進めている。

ミオイノシトール輸送体については、HMITに加えて Na^+ との共輸送体であるSMIT (GLUT型遺伝子ファミリーに属さない) が知られており、RT-PCR法により調べたところ血管条組織にその遺伝子発現が初めて確認された。ミオイノシトールは細胞内情報伝達や浸透圧調節など多様な機能を有しており、今後注目すべき輸送体と考えられた。

(3) 糖輸送体タンパク質の局在解析

ラット蝸牛凍結切片を用いて免疫染色により局在解析したところ、GLUT1に加えて、GLUT4およびGLUT10が基底細胞に発現することが示唆された(図3)。血管条におけるグルコース輸送経路として、基底細胞を介する外リンパからの流入経路が予想された。

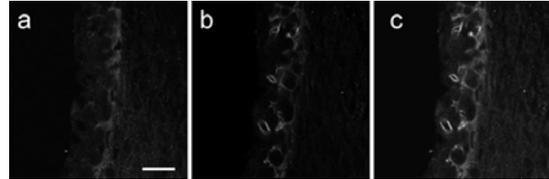


図3. 免疫組織化学法によるGLUT10の局在。
(a) GLUT10, (b) GLUT1, (c) GLUT10 & -1.

HMITは辺縁細胞にその強い陽性シグナルが認められた。脳や腎臓において、HMITはイノシトールリン脂質の代謝に関与すると考えられている。HMITは H^+ の輸送にも関わっていることから、内リンパ液のpH調節に関与している可能性も示唆された。内耳液性制御機構に重要な役割を果たしていると予想された。

(4) 糖輸送経路の解明

蛍光グルコース誘導体(6-NBDG)を血中に投与後、直ちに血管条を摘出し、その蛍光分布を解析した。6-NBDG由来の蛍光が、辺縁細胞基底側膜を超えて辺縁細胞層に拡散していることが判明した(図4)。辺縁細胞への生理的なグルコース取り込みが証明された。

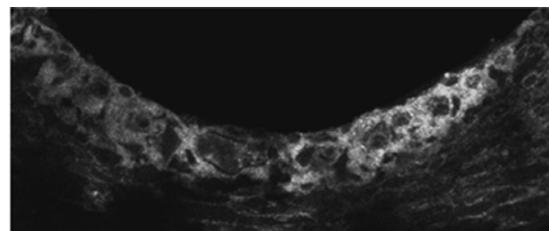


図4. グルコース誘導体による蛍光イメージング。

(5) 血管系と機能分子の新しい同時観察法の開発

血管条において毛細血管網と機能分子の組織構造を保持したまま3次元観察可能となる新たな方法を開発した(図5)。本法の特徴は、メタクリレート系樹脂が蛍光特性を有することを利用し、いわゆるcorrosion castingと呼ばれる血管鑄型法とは異なり、血管内に樹脂を注入するものの組織を取り除くことなく蛍光観察できる点にある。この手法は毛細血管網が発達した他の組織にも応用可能であり、これまで困難であった血管と特異的な機能を有する細胞との関係についての3次元的解析を可能とする。

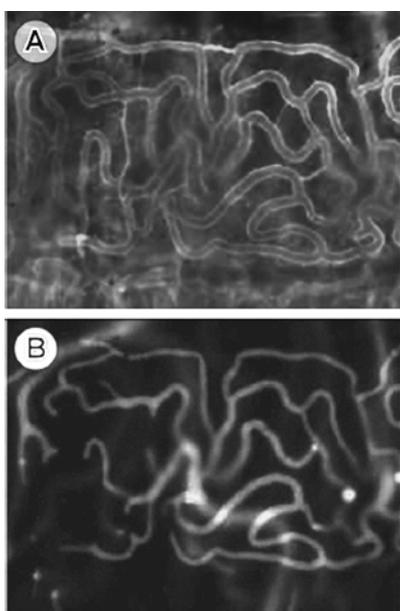


図5. 免疫組織化学法と蛍光樹脂注入法を併用した一例。(A) type IV collagen, (B) Mercox® resin.

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5件)

① Edamatsu M, Hishikawa S, Kondo Y, Ando M. Three-dimensional observation of the vascular networks and functional proteins in the cochlear stria vascularis using a non-corroded casting method combined with

an immunohistochemical analysis.

Bioimages, 査読有, 2012, 20: 9-15.

② Edamatsu M, Kondo Y, Ando M. Multiple expression of glucose transporters in the lateral wall of the cochlear duct studied by quantitative real-time PCR assay.

Neurosci Lett, 査読有, 2011, 490: 72-77.

③ Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Yamasaki F, Sato T. Differential regulation of TNF receptors by vagal nerve stimulation protect heart against acute ischemic injury. 査読有, *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 49: 234-44.

④ Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Sato T. Engineered heart tissue: a novel tool to study the ischemic changes of the heart in vitro. *PLoS One*, 査読有, 2010, 5:e9275.

⑤ 安藤元紀. 聴覚機能におけるエネルギー供給システムの解明. *生物学に関する試験研究論叢*, 査読無, 2010, 25: 72-77.

[学会発表] (計9件)

① Higuchi S, Edamatsu M, Kondo Y, Ando M. Identification of epithelial cells in the tegmentum vasculosum of the chicken cochlea by immunofluorescence microscopy. 第83回日本動物学会大会, 2012年9月15日, 予稿集 p.148, Osaka.

② Hishikawa S, Edamatsu M, Ando M. Assessment of glucose uptake in the cochlear stria marginal cells with a fluorescent tracer method combined with immunohistochemistry. 第83回日本動物学会大会, 2012年9月15日, 予稿集 p.149, Osaka.

③ Ikeda N, Hishikawa S, Edamatsu M, Ando M. Postnatal expression and localization of glucose transporters in the lateral wall of the cochlear duct. 第83回日本動

物学会大会, 2012年9月15日, 予稿集 p.149, Osaka.

④ Edamatsu M, Kondo Y, Ando M.
Immunohistochemical localization of myo-inositol transporters, HMIT and SMIT1, in the lateral wall of the rat cochlea. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC), 2012年8月28日, Abstracts p.118, Kyoto, Japan.

⑤ Hishikawa S, Edamatsu M, Ando M. Direct evidence of glucose uptake in strial marginal cells of the cochlea: Application of a fluorescent tracer method combined with immunohistochemistry. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC), 2012年8月28日, Abstracts p.118, Kyoto, Japan.

⑥ Edamatsu M, Haruna K, Kondo Y, Ando M. Immunohistochemical localization of H⁺-coupled myo-inositol cotransporter (HMIT) in the rat cochlea. 第82回日本動物学会大会, 2011年9月22日, 予稿集, p.138, Asahikawa.

⑦ Hishikawa S, Edamatsu M, Ando M. Immunohistochemical localization of glucose transporters (GLUT5, -10) in the rat cochlea. 第82回日本動物学会大会, 2011年9月22日, 予稿集, p.139, Asahikawa.

⑧ Higuchi S, Edamatsu M, Kondo Y, Ando M. Immunohistochemical localization of glucose transporter (GLUT1) in the chicken cochlea. 第82回日本動物学会大会, 2011年9月22日, 予稿集, p.139, Asahikawa.

⑨ Edamatsu M, Date E, Ikeda N, Kondo Y, Ando M. Expression and localization of myo-inositol transporters in the lateral wall of the cochlear duct. 第81回日本動物

物学会大会, 2010年9月25日, 予稿集 p.132, Tokyo.

[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を利用し, 随時更新・公表している。

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・教授

研究者番号: 20222789

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし