

|         |                                                                                                      |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名      | 枝松 緑                                                                                                 |
| 授与した学位  | 博士                                                                                                   |
| 専攻分野の名称 | 学術                                                                                                   |
| 学位授与番号  | 博甲第4782号                                                                                             |
| 学位授与の日付 | 平成25年 3月25日                                                                                          |
| 学位授与の要件 | 自然科学研究科 バイオサイエンス専攻<br>(学位規則第5条第1項該当)                                                                 |
| 学位論文の題目 | Studies on glucose transport mechanisms in the cochlear stria vascularis<br>(内耳蝸牛血管条における糖輸送機構に関する研究) |
| 論文審査委員  | 教授 近藤 康博 准教授 安藤 元紀 准教授 畑生 俊光                                                                         |

### 学位論文内容の要旨

哺乳類内耳蝸牛血管条は、内リンパ直流電位の生成および内リンパ産生を担い、この特徴は聴覚機能の発現に必要な不可欠である。血管条の機能不全は直ちに難聴を引き起こす。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、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っている。しかし、この高い代謝活性を維持するための糖輸送機構については不明であった。本研究では、内耳血管条の糖輸送機構を解明するために、血管条組織における糖輸送体の発現およびその局在について網羅的な解析を試みた。また、組織構築そのものにその機能発現が密接に関連している血管条において、膜輸送体分子と毛細血管網の関係を解析可能な新しい同時観察法の開発を行った。

糖輸送体として促進拡散 (GLUT) 型と  $\text{Na}^+$  共輸送 (SGLT) 型の二種類の gene family について、通常の RT-PCR 法によりそれらの遺伝子発現を調べた。蝸牛管側壁において GLUT 型の 8 つの輸送体の発現が確認されたが、SGLT 型の発現は認められなかった。そこで発現が確認された GLUT について、定量 PCR 法により血管条と隣り合うラセン靱帯における発現量の比較を行った。両組織における相対発現比は、GLUT1 と -5, -13 は血管条に多く、GLUT4 と -10 はラセン靱帯に多く発現することが分かった。このうち GLUT1 と -4, -10 について免疫組織化学法により局在解析を行った。

血管条における GLUT1 の局在は動物種で異なるという報告があり、複数のげっ歯類を用いて検討した。GLUT1 の局在は動物種において差異はなく、基底細胞と血管内皮細胞にのみ発現し、辺縁細胞には発現していないことが判明した。GLUT4 と -10 はそれぞれ基底細胞に局在している可能性が示唆された。これらの結果より、エネルギー要求性の高い辺縁細胞が利用可能なグルコース輸送経路として、血管網からの経路に加えて、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。

糖輸送体遺伝子の網羅的な発現解析から、血管条において GLUT13 (HMIT) の発現が初めて確認された。HMIT は GLUT 型に属しているが、実質的には  $\text{H}^+$  と *myo*-inositol (MI) の共輸送体であることが報告されている。HMIT の血管条における局在を検討した。MI 輸送体としては  $\text{Na}^+$ /MI 共輸送体 (SMIT) も報告されており、SMIT1 についても合わせて検討した。HMIT は辺縁細胞と基底細胞に、SMIT1 は基底細胞に発現することが判明した。脳や腎臓において、HMIT はイノシトールリン脂質の代謝に、SMIT1 は浸透圧調節に関与すると考えられており、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。

血管条における毛細血管網と機能分子の関係について、組織構造を保持したまま 3 次元観察可能とする新たな方法を開発した。本法の特徴は、メタクリレート系樹脂 (Mercox resin®) が蛍光特性を有することを利用し、いわゆる corrosion casting と呼ばれる血管鋳型法とは異なり、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。加えて、樹脂注入標本に蛍光免疫染色法を併用し共焦点レーザー顕微鏡による 3 次元観察も可能とした。本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、血管網と機能分子の関係を解明する新たな手法と成り得る。

## 論文審査結果の要旨

内耳の蝸牛において聴覚に關与する有毛細胞の活性にはそれらが直接接する中央階の内リンパ液の特殊な組成（高い $K^+$ 濃度）が必須の条件である。中央階のこの $K^+$ 組成は蝸牛側壁を介する $K^+$ の循環によって維持されている。血管条は辺縁，中間，基底細胞および毛細血管網からなっている。血管条は活発なイオン輸送を行っており，その輸送エネルギーとしてグルコースが利用されることが知られている。本研究では，ラットとモルモットを用いて血管条とその外側のラセン靭帯における糖輸送体について追究している。

哺乳類の糖輸送体には促通型単輸送体（GLUT）とNa/グルコース共輸送体（SGLT）が知られている。ラットの血管条とラセン靭帯ではGLUT1,3,4,5,8,10,12,13の発現が確認されたが，SGLTの発現は認められなかった。GLUTのうち1と10について局在解析を行った。GLUT1はラット，モルモットともに，基底細胞と毛細血管網のみに発現していること，GLUT10は基底細胞に発現していることが示された。これらの結果から，血管条のグルコース輸送経路として毛細血管に加えて基底細胞を介する外リンパ液からの流入経路が示された。辺縁細胞におけるグルコース輸送体はいまだ不明であり，遺伝子発現が確認された他のGLUTについての局在を検討中である。遺伝子発現が確認されたGLUT4はインスリン依存性の輸送体である。局在解析によってGLUT4は基底細胞に発現していることが示され，また，血管条では，インスリン受容体や受容体基質（IRS1,2）の遺伝子発現が確認された。これらの結果から血管条ではインスリン作用によって調節を受けるグルコース輸送機構の存在が示唆された。 $^3H$ /ミオシンイノシトール輸送体のうちSMIT1は辺縁細胞と基底細胞に同2は基底細胞に発現していた。これらの輸送体は内リンパ液のpH調節に關与しており，内耳の液性調節に重要な役割を演じていると予想された。これらの糖輸送体解析に加えて，血管条の形態を蛍光特性を持つメタクリン系樹脂の血管注入と共焦点レーザー顕微鏡による3次元観察を併用して詳細に解析している。

以上の結果は，哺乳類の内耳の内リンパ液組成形成における血管条の糖輸送体の様態を明らかにした点で博士（学術）の学位授与に十分値する内容として評価される。