

氏名・(本籍) 于 順 (中国)
学位の種類 博士(医学)
学位記番号 博士第290号
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日 平成10年3月24日
学位論文題目 Immunohistochemical Localization of Glucose Transporters (GLUT 1 and GLUT 3) in the Rat Hypothalamus
(ラット視床下部における1型および3型グルコーストランスポーターの免疫組織化学的局在)

審査委員 主査 教授 堀池 喜八郎
副査 教授 犬伏 俊郎
副査 教授 佐伯 行一

論文内容の要旨

【目的】

摂食行動は化学感受性ニューロンを介する中枢性制御をうけている。視床下部の化学感受性ニューロンとしては、視床下部外側野にあるグルコース感受性ニューロンと腹内側核にあるグルコース受容ニューロンが代表的なものであり、グルコセンサーと称されている。さらに最近では、第三脳室上衣細胞もグルコセンサー機能をもつことが報告されている。グルコースは運搬体蛋白による促進拡散によって脳細胞に供給され、重要な代謝基質として利用される。脳にはこのような運搬体蛋白として1型および3型グルコーストランスポーター (GLUT 1とGLUT 3) が多く発現していることから、GLUT 1とGLUT 3が視床下部のグルコセンサー機構に関与していることが推測されている。しかし、視床下部におけるGLUT 1とGLUT 3の局在および分布様式については解明されていない。そこで本研究では、ラット視床下部におけるGLUT 1とGLUT 3の局在を免疫組織化学的に検討した。

【方法】

抗体の作製 GLUT 1とGLUT 3のC末端アミノ酸配列の一部に相当するペプチドを合成し、水溶性カルボジイミドを用いてポリグルタミン酸に結合してハプテン抗原とした。これを家兎に免疫して抗体を得た。抗体の特異性はウエスタンブロット法および吸収テストで検定した。

ウエスタンブロット法 ラット脳をトリス緩衝液中でホモジネートし、遠心分離後、上清を粗細胞質分画として分取した。この粗細胞質分画を15%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、PVDF膜に転写した。この膜を1万倍に希釈したGLUT 1あるいはGLUT 3抗血清と4℃で一晩反応させ、免疫化学的に検出した。

免疫組織化学 Wistar系雄性ラットを用いた。10mMの生食加リン酸緩衝液、4%パラホルムアルデヒドと0.35%グルタルアルデヒドを含む固定液で灌流固定した後、脳を摘出し4%パラホルムアルデヒドで後固定した。15%蔗糖加リン酸緩衝液に2日間浸漬した後、クリオスタットで20μmの連続切片を作製し免疫組織化学に供した。

免疫染色は、切片を各抗体と3日間反応させた後、ABC法で行った。免疫二重染色ではニッケル加ジアミノベンチジン溶液による青色の呈色反応によってGLUT 1を、ニッケルを含まない茶色の呈色反応によって各種グリアマーカーを染め分けた。グリアマーカーとしては、アストロサイトの検出にグリア線維性酸性蛋白 (GFAP) 抗体を、ミクログリアの検出にOX42抗体を用いた。

対照実験 吸収抗血清を用いた対照実験ではウエスタンブロット法、免疫組織化学法ともに陽性所見を認めなかった。

【結果】

ウエスタンブロット法ではGLUT 1抗体によって粗細胞質分画に45-50kDaの単一バンドを、GL

UT 3 抗体によって50-60kDaの単一バンドをそれぞれ検出した。検出されたバンドはそれぞれ既報告の分子量に一致した。免疫組織化学的には、視床下部全域にGLUT 1 陽性グリア細胞が多数観察され、血管内皮細胞にも弱いながらGLUT 1 免疫活性が認められた。免疫二重染色によってGLUT 1 陽性グリア細胞の一部はGFAP陽性のアストロサイトと確認されたが、大多数はGFAP陰性、OX42陰性であった。一方、GLUT 3 はニューロンと第三脳室上衣細胞に観察された。GLUT 3 免疫陽性ニューロンは、外側および内側視束前野、視索上核、室旁核、室周囲核、背内側核、外側野に散在していた。視床下部外側野のGLUT 3 免疫陽性ニューロンは大型であった。

【考 察】

GLUT 1 免疫活性は、既報告どおり、ラットの脳血管内皮細胞とグリア細胞に局在していた。GLUT 1 を発現するグリア細胞種についてはこれまで不明であったが、本研究ではその一部がアストロサイトであることを二重染色によって確認した。しかし、多数のGLUT 1 陽性グリア細胞はGFAP、OX42ともに陰性であり、GFAP陰性のアストロサイトあるいはオリゴデンドロサイトであると推測される。今後、免疫電顕での確認が必要である。GLUT 1 の脳内における役割については不明であるが、血管内皮細胞における局在は血液-脳間のグルコース輸送への関与を示している。一方、GLUT 3 は視床下部諸核のニューロンと第三脳室上衣細胞に局在していた。陽性反応を示す視床下部外側野の大型ニューロンや第三脳室上衣細胞はグルコセンサーとしての機能を備えていることから、GLUT 3 はグルコセンサーを介する中枢性食欲調節機構の一部として機能している可能性が示唆される。

【結 語】

ラット視床下部では、GLUT 1 免疫活性はグリア細胞と血管内皮細胞に、GLUT 3 免疫活性は視床下部の特定領域のニューロンと第三脳室上衣細胞に局在していた。この分布様式は、それぞれのグルコーストランスポーターが機能分担して脳へのエネルギー源供給や中枢性摂食調節に関わっていることを示している。

論文審査の結果の要旨

本研究は、摂食行動の中枢性制御や脳でのエネルギー代謝の機構を解明すべく、1型と3型のグルコーストランスポーター (GLUT 1、GLUT 3) それぞれのC末端アミノ酸配列に対する抗体を作製し、ラット視床下部におけるGLUT 1 とGLUT 3 の局在を免疫組織化学的に検討したものである。その結果、GLUT 1 は星状グリア細胞・稀突起グリア細胞・血管内皮細胞に局在すること、GLUT 3 は視床下部の特定領域のニューロンと上衣細胞に局在すること、特にグルコースセンサーとしての機能をもつ、視床下部外側野の大型ニューロンや第三脳室上衣細胞にはGLUT 3 が発現していることを明らかにした。これらの成果は、血液-脳関門でのGLUT 1 によるグルコース輸送ならびに中枢性食欲調節へのGLUT 3 の関与を示唆し、脳のエネルギー代謝および中枢神経系による摂食調節の解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年2月19日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。