

学位論文題名

消化管におけるモノカルボン酸輸送体 (SMCTとMCT)
の発現様式

学位論文内容の要旨

【背景と目的】小腸で吸収されなかった植物由来の食物繊維と難消化性糖質は、大腸内の腸内細菌による発酵の結果分解され、短鎖脂肪酸(酢酸、プロピオン酸、酪酸)を産生する。短鎖脂肪酸は、乳酸、ケトン体とともにモノカルボン酸に分類される有機酸である。これらの短鎖脂肪酸は腸上皮を介して吸収され、エネルギーとして利用される。最近になり、モノカルボン酸に特異的なトランスポーターが同定され、消化管での短鎖脂肪酸の取り込みや生体でのモノカルボン酸の動態がある程度説明できるようになった。本研究の目的は、消化管を中心に2つのタイプのモノカルボン酸輸送体を発現する細胞の分布と細胞内局在を明らかにすることである。最初に同定された monocarboxylate transporter (MCT) は H^+ との共輸送体で、これまでに10種を超えるサブタイプの存在が示唆されている。その後、大腸がん抑制遺伝子の探索から Na^+ 依存性の輸送体が同定され、SMCTと呼ばれるようになった。SMCTには2つのサブタイプがある。

【材料と方法】マウスの消化管、腎臓などを使い、形態学的解析は *in situ* hybridization 法と免疫組織化学により行った。アンチセンス合成オリゴヌクレオチドを ^{32}P で標識したものをプローブに用い、*in situ* hybridization 法を行った。SMCTについてはSMCT1とSMCT2、MCTに関しては主要なMCT1-MCT4のほかMCT8について解析した。*In situ* hybridization 法の結果を補うためにリアルタイムPCR法も実行した。免疫組織化学は、SMCT1、SMCT2およびMCT1に対する抗体を用い、蛍光抗体法、ABC法、電顕レベルの金コロイド銀増感法を行った。

【結果】 Na^+ シンポーターであるSMCT1は回腸の末端部から直腸にかけて発現し、とくに遠位結腸から直腸での発現が強かった。この発現パターンはリアルタイムPCRによる定量結果と一致していた。免疫組織化学では、陰窩上皮の管腔側が特異的に染まり、電顕レベルで線条縁(刷子縁)に相当していた。一方、SMCT2の発現は空腸で最も強く、近位回腸で弱い発現が見られた以外は、十二指腸や大腸での発現は見られなかった。この発現パターンもリアルタイムPCRの所見と完全に一致した。SMCTの腸管全域での発現は、SMCT1とSMCT2が相補的な位置関係を示したことになる。

MCTファミリーの中では、MCT1が消化管で十分な強さの発現を示した。ほかのメンバーの中ではMCT2のみが胃体部粘膜で強く発現していたに過ぎない。MCT1は大腸での発現が強く、とくに盲腸と遠位結腸で最大値を示したが、近位結腸ではやや弱い発現であった。胃や小腸でも弱いがコンスタントな発現が見られた。なお、この発現パターンもリアルタイムPCRで確認された。免疫組織化学では、大腸を通じて表面上皮と陰窩上皮の側基底面の細胞膜 basolateral membrane に特異的に陽性反応が観察された。陰窩の底部では杯細胞が占めるため、反応は微弱となる。SMCT1とMCT1の二重染色では、陰窩の中央部では両者が共存するが、表面上皮や陰窩下部ではMCT1の反応だけが認められた。大腸の電顕レベルの観察では、タイト結合より下の細胞側面から次第に強くなる反応が側面下部から基底面にかけて広がっていた。細胞質での反応は認められなかった。

小腸の免疫組織化学により、MCT1の陽性反応が陰窩から絨毛の基部にかけて上皮の側基底面 basolateral membrane に見られた。BrdUとの二重染色により、BrdU陽性の未分化細胞が染まることを確認できた。分裂中の細胞もMCT1を発現し、分裂していない細胞よりも細胞膜が厚く染まっていた。また基底膜にむけて伸びる「茎」のような部分も強く染色された。電顕下では、分裂期の細胞では細胞膜にヒダや突起(微絨毛)があるために、細胞の輪郭が

陽性反応により厚く見えることが判明した。

胃では、腺胃の胃小窩の底部から腺頸部にかけての増殖帯とよばれる領域がMCT1に陽性を示した。ここでもやはり細胞の側基底面、とくに基底面が強く染まっていた。

【考察】短鎖脂肪酸などモノカルボン酸の動態を追うことは難しいが、特異的な輸送体の発現を調べることで、おおよその動きや利用組織を判定することができる。本研究では、2種類のモノカルボン酸輸送体、とくに細胞レベルで出し入れを担当する輸送体を同時に解析することに意義があると思われる。

SMCT1は細胞内外のNa⁺濃度勾配を利用して、細胞内にモノカルボン酸を取り込む輸送体である。消化管では上皮の管腔側に局在し、短鎖脂肪酸が産生される大腸で強く発現することは目的にかなっている。SMCT1は起電性の輸送を行うので、基質とともに水が移動する。従って、大腸では短鎖脂肪酸の吸収は水分の吸収による糞便の固形化にも寄与すると思われる。SMCT1の回腸末端部での強い発現の意義は不明である。ここで産生された短鎖脂肪酸もしくは盲腸から逆流した短鎖脂肪酸の吸収に与るのであろう。

SMCT2はSMCT1と基質は共通しているが、親和性が低いことが特徴である。消化管では空腸にSMCT2が発現するが、ここでは腸内発酵はほとんど行われないので、食事由来のモノカルボン酸—ヒトの例を示すと、酢、発酵食品や乳製品に含まれる乳酸の吸収に関与している可能性がある。SMCT1とSMCT2の配置は腎臓で考えると理解しやすい。腎臓では糸球体に続く近位尿細管の起始部（S1分節）にはSMCT2が、それより遠位のS2およびS3分節ではSMCT1が発現しており、SMCT2により原尿中の乳酸濃度が低下すると、SMCT1が働く仕掛けになっていると思われる。小腸では、食事由来のモノカルボン酸の濃度は非常に高いはずである。

最初にMCT1を同定した研究はMCT1が大腸に強く発現し、上皮細胞の側基底面に局在することを報告したが、その後の研究ではMCT1が小腸に強く発現することや細胞の管腔側に発現するという報告が続いたため、混乱が生じた。本研究は、MCT1が消化管の主要なMCTであり、大腸に強く発現すること、細胞の側基底面に限局した発現を示すことを確実にした。ほかのサブタイプでは、MCT2が胃の壁細胞領域に発現していたに過ぎない。

MCT1が小腸や胃の細胞増殖帯に集中して発現し、とくに分裂中の細胞が強く標識されたことは注目に値する。ここ以外にも骨髄の造血細胞や皮膚の増殖部位の細胞が共通してMCT1を強く発現していた。低酸素状態が細胞の分裂・増殖を刺激するが、このとき解糖系の亢進がみられるという。総合的に考えると、細胞の分化増殖にはグルコースよりもモノカルボン酸が栄養素として重要であることが示唆される。

【結論】本研究では、MCTとSMCTの消化管での発現を組織化学的に解析した。モノカルボン酸に特異的な輸送体の発現を調べることで、消化管でのモノカルボン酸の産生、吸収、栄養素としての生物学的意義を明らかにできた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 邊 雅 彦
副 査 教 授 神 谷 温 之
副 査 教 授 岩 永 敏 彦

学位論文題名

消化管におけるモノカルボン酸輸送体 (SMCTとMCT) の発現様式

小腸で吸収されなかった植物由来の食物繊維と難消化性糖質は、大腸内の腸内細菌による発酵の結果分解され、短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸）を産生する。短鎖脂肪酸は、乳酸、ケトン体とともにモノカルボン酸に分類される有機酸である。これらの短鎖脂肪酸は腸上皮を介して吸収され、エネルギーとして利用される。最近になり、モノカルボン酸に特異的なトランスポーターが同定され、消化管での短鎖脂肪酸の取り込みや生体でのモノカルボン酸の動態がある程度説明できるようになった。本研究の目的は、消化管を中心に2つのタイプのモノカルボン酸輸送体を発現する細胞の分布と細胞内局在を明らかにすることであった。最初に同定された monocarboxylate transporter (MCT)は H^+ との共輸送体で、これまでに10種を超えるサブタイプが存在が示唆されている。その後、大腸がん抑制遺伝子の探索から Na^+ 依存性の輸送体が同定され、SMCTと呼ばれるようになった。SMCTには2つのサブタイプがある。

本研究では、マウスの消化管、腎臓などを使い、形態学的解析は *in situ hybridization* 法と免疫組織化学によった。*In situ hybridization* 法の結果を補うためにリアルタイムPCR法も実行した。

SMCT1は回腸の末端部から直腸にかけて発現し、とくに遠位結腸から直腸での発現が強かった。免疫組織化学では、陰窩上皮の管腔側が特異的に染まり、電顕レベルで刷子縁に相当していた。一方、SMCT2の発現は空腸で最も強く、近位回腸で弱い発現が見られた以外は、十二指腸や大腸での発現は見られなかった。SMCTの腸管全域での発現は、SMCT1とSMCT2が相補的な位置関係を示したことになる。

MCTファミリーの中では、MCT1が消化管で十分な強さの発現を示した。ほかのメンバーの中では、MCT2のみが胃体部粘膜で強く発現していたに過ぎない。MCT1は大腸での発現が強く、とくに盲腸と遠位結腸で最大値を示した。胃や小腸でも弱いがコンスタントな発現が見られた。免疫組織化学では、胃腸を通じて上皮の側基底面の細胞膜 *basolateral membrane* に特異的に陽性反応が観察された。

小腸の免疫組織化学により、MCT1の陽性反応が陰窩から絨毛の基部にかけて上皮の側基底面に見られた。分裂中の細胞もMCT1を発現し、分裂していない細胞よりも細胞膜が厚く染まっていた。胃では、胃小窩の底部から腺頸部にかけての増殖帯とよばれる領域がMCT1に陽性を示した。

モノカルボン酸の動態を追うことは難しいが、特異的な輸送体の発現を調べることで、その動きや利用組織を判定できることを示した研究である。本研究では、2種類のモノカルボン酸輸送体、とくに細胞レベルで出し入れを担当する輸送体を同時に解析したことに意義があると思われる。SMCT1は細胞内外の Na^+ 濃度勾配を利用して、細胞内にモノカルボン酸を取り込む輸送体である。消化管では上皮の管腔側に局在し、短鎖脂肪酸が産生される大腸で強く発現することは目的にかなっている。SMCT2はSMCT1と基質は共通しているが、親和性が低いことが特徴である。消化管では空腸にSMCT2が発現し、食事由来のモノカルボン酸（酢、発酵食品や乳製品に含まれる乳酸）の吸収に関与している可能性が示された。ついで、本研究は、MCT1が消化管の主要なMCTであり、大腸に強く発現すること、細胞の側基底面に限局した発現を示すことを確実にした。MCT1が小腸や胃の細胞増殖帯に集中して発現し、とくに分裂中の細胞が強く標識されたことは注目に値する。細胞の分化増殖にはグルコースよりもモノカルボン酸が栄養素として重要であることを示したといえる。

発表後の質疑応答では、①共輸送される基質が違うことの意味づけ、②SMCTとMCTの輸送力の強さの違い、③モノカルボン酸と細胞増殖との関係を確実にするための方策、④KOマウスでの表現方、⑤管腔側と側基底側へトランスポーターを振り分ける機序、⑥SMCTとMCTが共存しない場合の輸送機構の解釈、などについて活発な質疑応答があった。申請者は文献上の情報を紹介しつつ、これらの質問に的確に回答していた。

この論文は、モノカルボン酸に特異的な輸送体の発現を調べることで、消化管でのモノカルボン酸の産生、吸収、栄養素としての生物学的意義を明らかにした点で高く評価され、栄養素の取り込みと利用機構の全貌解明が今後期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。