

助成番号 0723

消化管における Na⁺/モノカルボン酸共輸送体の発現解析と役割

岩永 敏彦¹, 宮内 正二²¹北海道大学大学院医学研究科, ²北海道大学大学院薬学研究院

概要 【目的】モノカルボン酸の輸送に関する分子には、H⁺依存性の MCT (monocarboxylate transporter) と Na⁺/glucose 共輸送体に分類される SMCT がある。上皮細胞の側基底面 basolateral membrane と管腔面に別れて局在する両輸送体の発現解析を消化管と腎臓で行い、モノカルボン酸輸送系の配置と意義を明らかにする。

【方法】マウスの消化管と腎臓における SMCT と MCT の発現様式を *in situ* hybridization 法と免疫組織化学により解析した。

【結果】SMCT は回腸末端から直腸にかけて発現するが、とくに大腸の中間点以降で発現が強くなる。この部位は糞塊形成部位に一致していることから SMCT が水分を取り込むことにより糞塊(固形便)の形成に関与することを強く示唆した。MCT1 は胃から肛門まで広く発現するが、やはり大腸での発現が強く、大腸での短鎖脂肪酸の産生と合致する。SMCT に匹敵する Na⁺/glucose 共輸送体である SGLT1 は小腸全体で強く発現していた。SGLT1 の大腸での発現は弱く、SMCT とは対照的であった。小腸でのグルコースの取り込みと大腸での短鎖脂肪酸の取り込みがともに Na⁺の濃度勾配を駆動力としている点は興味深い。SMCT は、消化管以外では腎臓にのみ発現する。MCT と MCT (計 12 サブタイプ) の発現を腎臓の丸ごとの切片を使って発現解析を行った。これらの中で強い発現を示したのは、SMCT、MCT2 そして MCT8 の 3 種であった。SMCT は皮質から髄質の外帯外層にかけて発現し、一方 MCT2 と MCT8 は、それぞれ髄質の外帯内層と皮質に限局していた。MCT1 の発現は上記三つの分子に比べると弱いものの、皮質に認められた。SMCT の免疫反応は近位尿細管のうち分節 S2 と S3 に限り、管腔側の刷子縁に見られた。一方、MCT1 の免疫反応は近位尿細管の S1 分節に、MCT2 のそれはヘンレのワナの上行脚以降に存在し、両者とも側基底面に局在した。

【考察】消化管でも腎臓においても、Na⁺の濃度勾配を利用して上流でグルコースを下流でモノカルボン酸を取り込むという図式が成り立っている点は興味深い。SMCT や MCT は基質認識においてカルボキシル基を必須とするが、ひとつのカルボキシル基をもっていれば、基質の母核はある程度の寛容性を示す。これを利用して、薬物の drug delivery system の改善に結びつけることができる。一方で、この基質認識の寛容さが故に、さまざまなモノカルボン酸医薬品の服用や暴露により、トランスポーターの生理的機能の障害および医薬品の細胞内蓄積に起因する副作用が惹起されると考えられる。

1. 研究目的

2003 年に同定されたある大腸癌抑制遺伝子は、その産物が構造上 Na⁺/glucose 共輸送体である SLC5 グループに属することがわかり、SLC5A8 と命名された (slc: solute-linked carrier)。SLC5A8 により Na⁺ と共輸送される基質は、大腸で食物繊維が細菌により分解されて生じる短鎖脂肪酸(酢酸, 酪酸, プロピオン酸)やピルビン酸、乳酸などの

モノカルボン酸であった(共同研究者の宮内が報告: Miyauchi *et al.* 2004)。2004~2005 年 我々は SLC5A8 が大腸上皮および尿細管の管腔側細胞膜に発現し、これらモノカルボン酸の取り込みを担うことを示した(Takebe *et al.* 2005)。これらの研究により、食物繊維が大腸癌の予防になることがある程度説明できるようになった。一方、モノカルボン酸の輸送に関する分子として、H⁺依存性の MCT

(monocarboxylate transporter) がすでに同定されていた (Garcia *et al.* 1994, 1995)。消化管では MCT1 が広範囲に、MCT2 が胃粘膜に限局して発現し、両方とも上皮細胞の側基底面 basolateral membrane に局在する。管腔側に存在する Na⁺ 共輸送体である SLC5A8 (以下 SMCT と呼ぶ) の登場により、細胞レベルで「モノカルボン酸の出し入れ」が説明できる状況になったわけである。本研究では、(1) マウスの消化管と腎臓における SMCT と MCT の発現様式および両者の共存関係を *in situ hybridization* 法と免疫組織化学により解析した。(2) SMCT は、陰イオン化したモノカルボン酸 1 分子に対し 4 分子以上の Na⁺ を共輸送するので、起電性の輸送になり、大量の水が移動する。大腸の SMCT は肛門側で強く発現することから、水と Na⁺ の吸収を介して消化生理 (糞塊形成や電解質代謝) に関与していること証明する。

2. 研究方法

SMCT と MCT ファミリーの発現解析: SMCT と MCT 遺伝子の発現様式を正常 adult マウスの消化管と腎臓で解析した。各組織から得た連続切片を用い、*in situ hybridization* 法により遺伝子発現を比較した。また、抗体を用いた二重蛍光抗体法により、両者の共存関係と細胞内局在を消化管と腎臓で検討した。両輸送体が細胞レベルでどの程度共存するのか、どういった栄養状態で共存関係が変化するかを突きとめることを目標にした。

用いた遺伝子プローブは既報の論文に掲載されている。用いた抗体は、ヒトの SMCT 569-610 に対するウサギ抗体 (RY1617) (Takebe *et al.* 2005) とニワトリ抗 MCT1 抗体 (AB1286, ケミコン社, Temecula, CA) で、切片と一晚反応させたのち、ビオチン化抗ウサギ抗体もしくは抗ニワトリ IgY 抗体と反応させた。最後に、アビジン・ペルオキシダーゼと反応し、H₂O₂ とジアミノベンチジンで発色させた。

二重染色では、上記抗体とともに、部位を特定するために、aquaporin2 (集合管のマーカー)、calbindin (接合管のマーカー)、CLC-K (ヘンレのワナの上行脚のマーカー) を用いて、二重蛍光抗体法にて染色した。

3. 研究結果

3.1 消化管を通じた SMCT、MCT および SGLT1 の発現

マウスの大腸において、粒状の硬い糞塊は遠位結腸で突然形成される。腸全域のサンプリングを行い、SMCT の発現レベルを詳細に (1 cm ごとに) *in situ hybridization* 法により解析した。SMCT は回腸末端部から大腸の直腸まで発現するが、とくに大腸の中間点付近で急に発現が強くなり、肛門までその発現を維持していた (Fig. 1)。大腸の中間点は、糞塊形成部位に一致していることから SMCT の発現が水分吸収を介して糞塊 (固形便) の形成に深く関与することを示している。

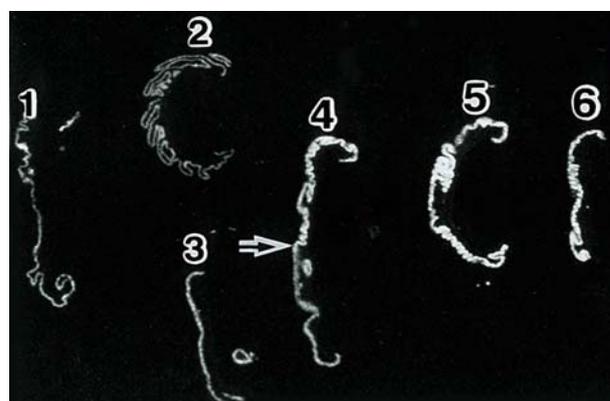


Fig. 1. *In situ hybridization* of SMCT mRNA throughout the large intestine. The large intestine of entire length is dissected out into 6 parts and numbered (from cecum: No.1 to rectum: No.6). An increased expression starts at the middle of part No. 4 and continues until the anus.

MCT1 は胃から肛門まで広く発現するが、やはり大腸での発現が強かった。中でも、盲腸や近位結腸での発現がより強かった (Fig. 3)。

SMCT に匹敵する Na⁺ 駆動性の輸送体としてグルコース輸送体 SGLT1 が、消化管には発現する。消化管での Na⁺ 共輸送体としては、SMCT とともに代表的なものである。そこで、SMCT と SGLT の発現を *in situ hybridization* 法で比較した。SGLT1 mRNA の発現を同じサンプルで検出したところ、SGLT1 は小腸全体で強く発現していた。ところが、SGLT1 mRNA の大腸での発現は弱く、SMCT とは対照的であった (Fig. 3)。なお、SGLT2 の発現は見られなかった。

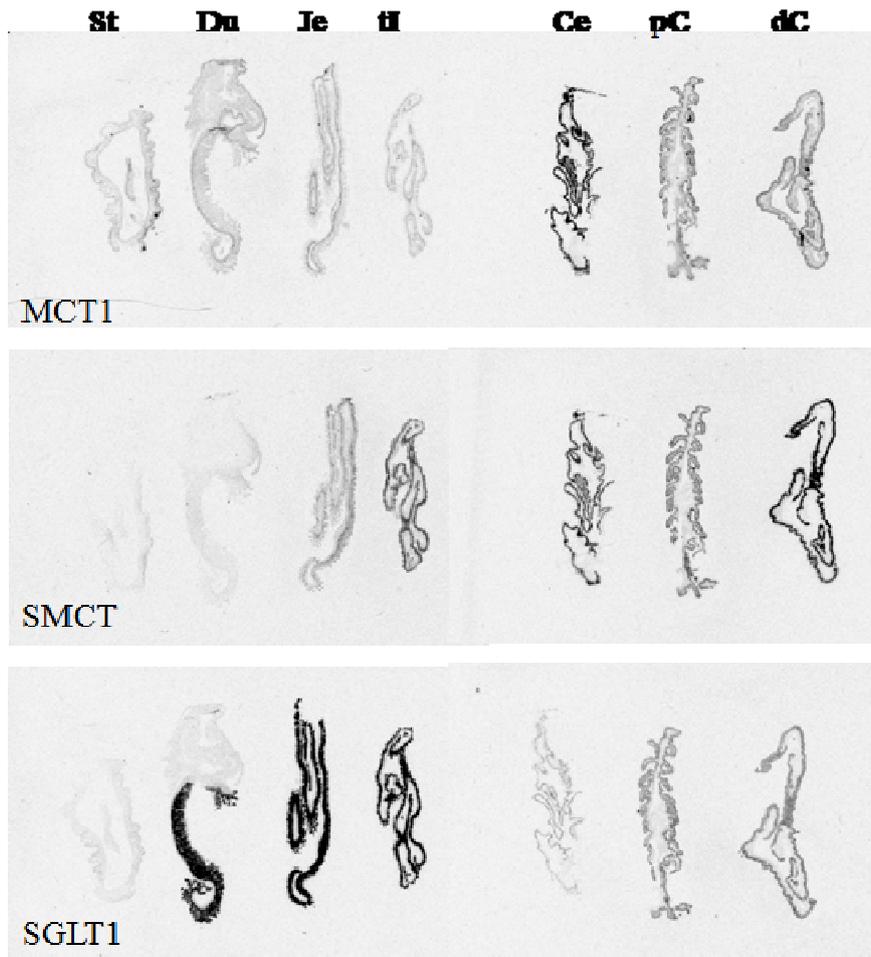


Fig. 3. mRNA expressions of MCT1, SMCT, and SGLT1 from the stomach to distal colon of mice. St: stomach, Du: duodenum, Je: junenum, tl: terminal ileum, Ce: cecum, pC and dC: proximal and distal colon.

3. 2 消化管上皮におけるモノカルボン酸輸送体 SMCT と MCT1 の局在部位

輸送体分子の細胞内局在は重要な解析目標であり、多重蛍光抗体法による観察と金コロイド法による電顕観察によって局在を検討した。上皮の場合では管腔側 apical、基底側 basolateral のいずれに存在するか、血管内皮では管腔側か実質側かを明らかにすることで輸送の向きとルートを決定することができる。

SMCT は大腸上皮の管腔側の線条縁(刷子縁)に特異的に存在していた。粘膜の表面上皮よりも陰窩上皮での発現が強かった。MCT1 は小腸での発現は弱い、陰窩上皮に発現し、そこでは側基底面 basolateral membrane に反応が見られた。大腸での MCT1 の発現は著しく強くなり、粘膜の表面上皮と陰窩において側基底面の細胞膜が強く染まっていた (Fig. 2)。



Fig. 2. Double immunostaining of SMCT and MCT1 in the cecum of a mouse. SMCT immunoreactivity (red) and MCT1 immunoreactivity (green) are localized at the brush border and baso-lateral membrane, respectively.

3.3 腎臓におけるSMCTとMCTの発現

SMCTは消化管以外では腎臓にのみ発現する。腎臓では、複数のMCTサブタイプの発現が報告されている。これらの関係を精査するために、腎臓に発現するSMCTとMCT(計12サブタイプ)の発現を腎臓の丸ごとの切片を使ってスクリーニング的に発現解析した(Fig. 4)。

これらの中で強い発現を示したのは、SMCT、MCT2そしてMCT8の3種であった。SMCTは皮質から髄質の外帯外層にかけて発現し、一方MCT2とMCT8は、それぞ

れ髄質の外帯内層と皮質に局限していた。MCT1は上記三つの分子に比べると弱いものの、皮質にのみ発現していた。

分布域からこれら輸送体を分類すると、(1)皮質に局限した発現を示すMCT1とMCT8、(2)皮質と外帯外層の両方に発現するSMCT、MCT5およびMCT9、(3)髄質の外帯内層に強く発現するMCT2の3グループに分けられた。

免疫組織化学により、SMCT、MCT1およびMCT2の局在を詳細に調べた。SMCTの免疫反応は近位尿細管のう

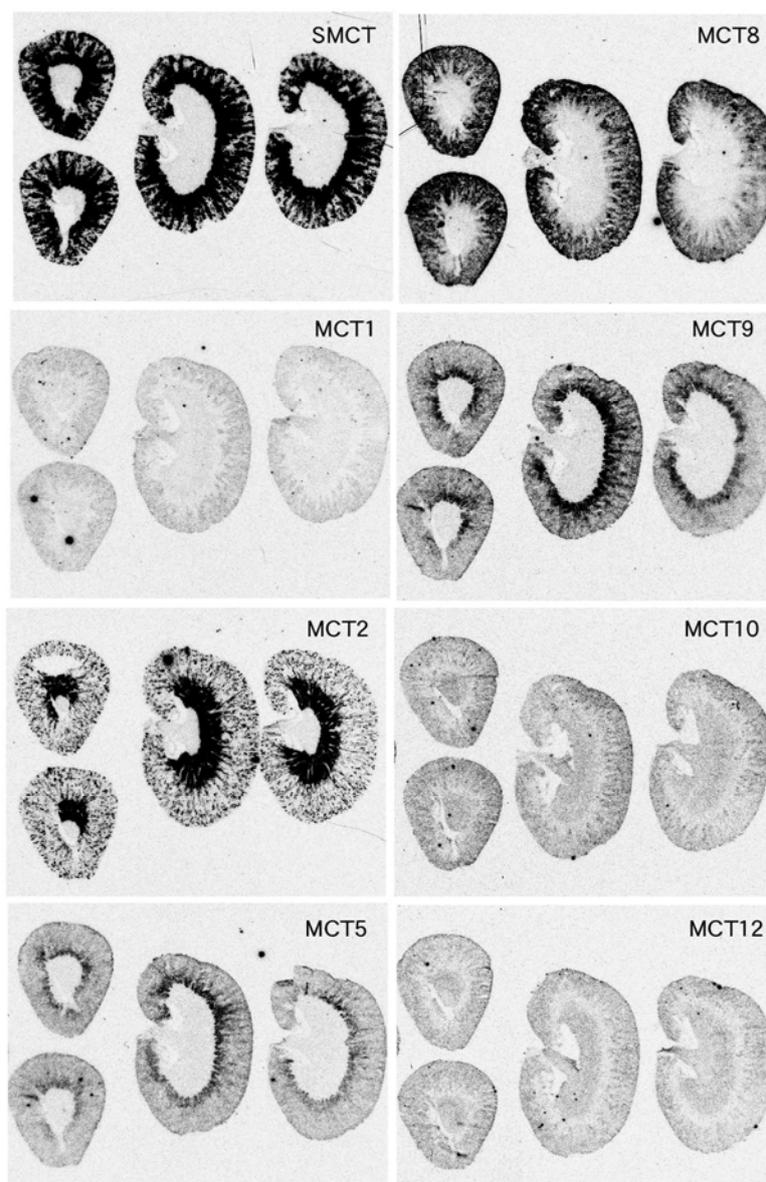


Fig. 4. X-ray film showing mRNA expressions for SMCT and seven MCT subtypes in the mouse kidney. The intense expression is seen in SMCT, MCT2 and MCT8.

ちS2とS3分節に限り、管腔側の刷子縁に認められた。一方、MCT1の反応は近位尿細管のS1分節に限定され、ここでは側基底面に存在した。従って、両者は共存しないことになる。MCT2は外帯内層に強く、しかも集中した免疫反応がそこに存在した。これは、ヘンレのワナ上行脚に相

当していた。MCT2の免疫反応は皮質の遠位尿細管にも連続し、さらには、皮質から髄質にかけての広い範囲で集合管にも認められた。遠位尿細管と集合管ともに、上皮細胞の側基底面がMCT2抗体に染まっていた(Fig. 5)。

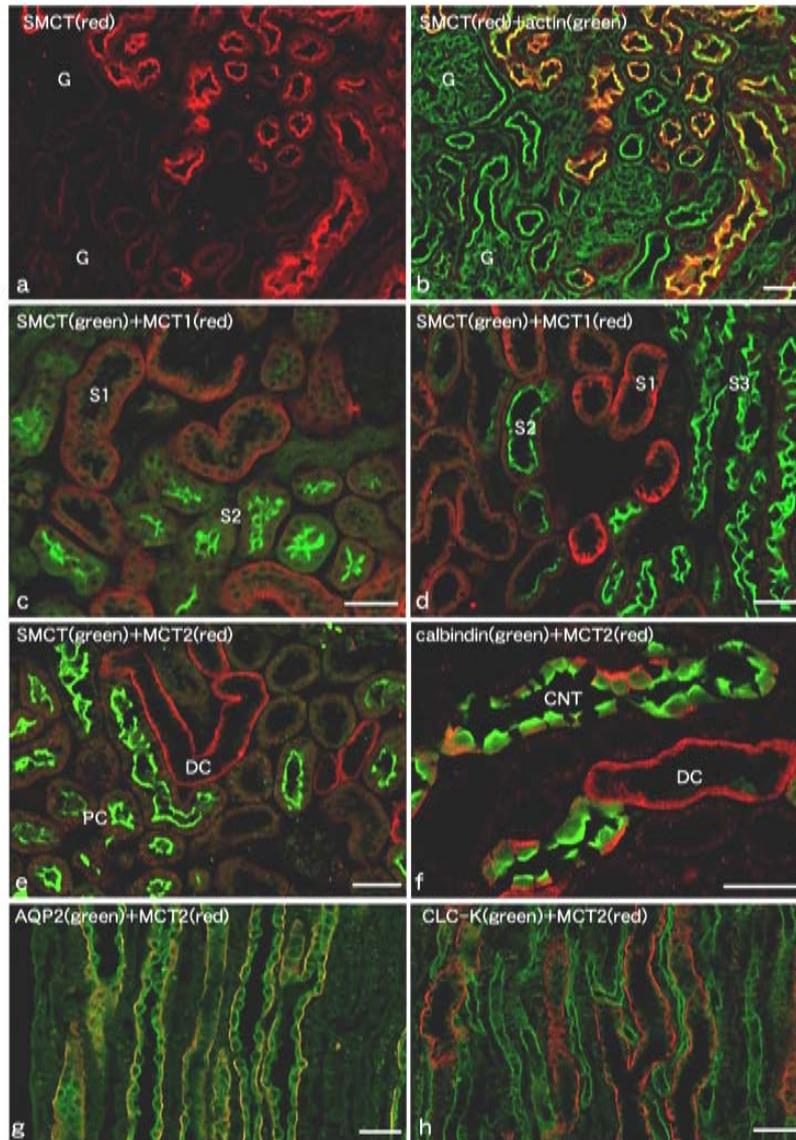


Fig. 5. Double staining of SMCT, MCT1, and MCT2 with markers. SMCT immunoreactivity is seen in the brush border (a). A superimposing of a phalloidin reaction on Fig. 1a shows the existence of SMCT-negative proximal tubules close to glomeruli (G), namely S1 (b). Double staining of SMCT and MCT1 in the mouse (c) and rat (d) shows that two immunoreactivities are differentially expressed. MCT2 in the cortex of rat kidney is localized in the distal convoluted tubules (DC), which are negative for SMCT (e) (PC: proximal convoluted tubules). Connecting tubules (CNT) in the rat kidney, labeled with calbindin antibody, are partially immunoreactive for MCT2 (f). Aquaporin2 (AQP2)-immunoreactive collecting ducts in the inner medulla of rat kidney are immunoreactive for MCT2 with selective labeling in the basal surface of cells (g), while CLC-K-immunoreactive thin ascending limbs are negative for MCT2 (h). Bars 50 μm.

4. 考 察

食物繊維が腸内発酵を受けて産生される酢酸、プロピオン酸、酪酸は短鎖脂肪酸に分類され、腸上皮そのものおよび生体にとって重要なエネルギー源になる。カフェテリア方式でラットに食物繊維の入った飼料とそうでない試料を選ばせると一定量の食物繊維を必ず食べるので、動物は食物繊維が体にいいことを知る手段をもっていると考えられる。短鎖脂肪酸の取り込み機構の本体は長い間不明であったが、それは消化管の管腔側に発現する選択的輸送体が同定されていなかったためである。2003年になり、大腸がん抑制遺伝子のひとつが同定された。その遺伝子産物は構造上 Na^+ /glucose 共輸送体である SLC5 グループに属することがわかり、SLC5A8 (SMCT) と命名された (Li *et al.* 2003)。そして、2004年に研究分担者の宮内らが、SMCT により能動的に輸送される基質は短鎖脂肪酸、ピルビン酸、乳酸であることをつきとめた (Miyachi *et al.* 2004)。本研究により、SMCT が大腸上皮細胞の管腔側細胞膜に発現し、短鎖脂肪酸の取り込みを担っていることが確実になった。以前から言われていた、食物繊維が大腸癌のリスクファクターを下げる効果をもつことや酪酸が大腸癌細胞の増殖を抑制するといった現象がある程度説明できるようになった。この輸送体は、短鎖脂肪酸、ピルビン酸、乳酸以外にケトン体にも親和性を持ち、生体内の短鎖のモノカルボン酸全般の輸送を担っていると思われる。

SMCT による輸送は水の移動を伴う。従って、管腔内の水分を吸収する作用も有する。今回の検索で、SMCT の発現が強くなる部位と糞塊形成の部位が一致していたことは、SMCT の水分取り込み能が高いことを強く支持する。

現在のところ、腸管で管腔側に発現する唯一のモノカルボン酸輸送体は SMCT のみで、側基底面に発現するのは MCT1 を含めて複数の MCT ファミリー分子が担当している。一方、グルコースの取り込みは主に小腸で起こり、管腔側に発現する SGLT1 が主要なトランスポーターである。従って、小腸でのグルコースの取り込みと大腸での短鎖脂肪酸の取り込みが、ともに Na^+ を駆動力としている点は興味深い。

SMCT は生体内では大腸と腎臓に特異的に発現する。腎臓の SMCT は刷子縁に局在することから、原尿中のモノカルボン酸、おもに乳酸を再吸収していると思われる。糸球体濾過液中の乳酸の 90% 以上は腎臓で再吸収され

るといわれている。腎尿細管において、SGLT との関係は興味もたれる。尿細管では SGLT2 が発現し、それは近位尿細管の始まりの部分、すなわち S1 分節に限局している。従って、尿細管ではグルコースを S1 分節にて、乳酸を S2-S3 分節において、ともに Na^+ 依存性に取り込むことになる。消化管でも腎臓においても、上流でグルコースを下流でモノカルボン酸を取り込むという図式が成り立っている。

消化管と腎臓で特異的に発現する SMCT は、薬学的にも有効な利用法がある。SMCT は基質認識においてカルボキシル基を必須とするが、ひとつのカルボキシル基をもっていれば、基質の母核はある程度の寛容性を示す。これを利用して、薬物の drug delivery system の改善に結びつけることができる。一方で、この基質認識の寛容さが故に、さまざまなモノカルボン酸医薬品の服用や暴露により、トランスポーターの生理的機能の障害および医薬品の細胞内蓄積に起因する副作用が惹起されると考えられる。副作用を伴うモノカルボン酸系医薬品が数多く存在するが、モノカルボン酸トランスポーターの基質認識機構が解明されれば、トランスポーターの機能障害を引き起こす医薬品の特定が容易になる (Itagaki *et al.* 2006)。さらに、その知見を機能障害を軽減するための対処療法の開発につなげることができる。

5. 今後の課題

SMCT は水の吸収を通して、糞塊形成に関与していることが予想されたので、本トランスポーターの阻害剤を使って、軟便(下痢)を誘発できるかを調べることを予定していたが、期間内に実行出来なかった。この阻害剤を含めて、カルボキシル基をもつ消炎・鎮痛薬(フェニルプロピオン類)は、SMCT と結合するが輸送されない。これらの医薬品はトランスポーターの基質サイトにはまり込み、生体にとって必須であるモノカルボン酸の輸送障害を引き起こすからである。その結果、消化性潰瘍、潰瘍性大腸炎、消化不良、下痢、急性腎不全、ネフローゼ症候群などを惹起するのではないかと予想している。上記の下痢誘発実験と同様にマウスとラットを用いて、これらの副作用(毒性)の惹起にトランスポーターが関与することを SMCT の基質であり、水の吸収を促進する短鎖脂肪酸を用いて実証することが今後の検討課題である。

文 献

Garcia CK *et al.* Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* 76: 865-873, 1994

Garcia CK *et al.* cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylates transporter expressed in different cells than MCT1. *J. Biol. Chem.* 270:1843-1849, 1995

Itagaki S *et al.* Interaction of ibuprofen and other structurally related NSAIDs with the sodium-coupled monocarboxylate transporter SMCT1 (SLC5A8). *Pharm. Res.* 23:1209-1216, 2006

Li H *et al.* SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8412-8417, 2003

Miyauchi S *et al.* Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na⁺-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 279: 13293-13296, 2004

Takebe K *et al.* Histochemical demonstration of a Na⁺-coupled transporter for short-chain fatty acids (Slc5a8) in the intestine and kidney of the mouse. *Biomed. Res.* 26: 213-221, 2005

No. 0723

Expression and Functional Analyses of Na⁺/Monocarboxylates Co-Transporters in the Intestine

Toshihiko Iwanaga¹, Seiji Miyauchi²

¹Hokkaido University Graduate School of Medicine

²Hokkaido University Graduate School of Pharmaceutical Sciences

Summary

Expression analysis of transporters selective for monocarboxylates such as lactate and ketone bodies in the intestine and kidney contributes to understanding the energy metabolism and the role of sodium in the transport of monocarboxylates. Distribution and expression intensity of a sodium-dependent monocarboxylate transporter (SMCT) and proton-coupled monocarboxylate transporters (MCT) were examined in the mouse intestine and kidney. Short-chain fatty acids (SCFA) are monocarboxylates produced by bacterial fermentation that play a crucial role in maintaining homeostasis in the large intestine. Two major transports for SCFA exist in the digestive tract. The expression of mucosal MCT1 in the mouse was most intense in the cecum, followed by the colon, but low in the stomach and small intestine. Among other MCT subtypes, only MCT2 was detected in the parietal cell region of the gastric mucosa. SMCT had predominant expression sites in the distal half of the large bowel and in the most terminal ileum. The mucosal MCT1 was localized in the basolateral membrane of enterocytes, while SMCT was restricted to the apical cell membrane, suggesting the involvement of SMCT in the uptake of luminal SCFA, and of MCT1 in the efflux of SCFA and monocarboxylate metabolites towards blood circulation. The large intestine expressed both types of the transporter, but their distribution patterns differed along the longitudinal axis of the intestine and along the perpendicular axis. *In situ* hybridization survey in the kidney detected significant mRNA expressions of SMCT and MCT-1, 2, 5, 8, 9, 10, and 12. Among these, signals for SMCT, MCT2 and MCT8 were predominant; transcripts of SMCT were restricted to the cortex and the outer stripe of outer medulla, while those of MCT2 and MCT8 gathered in the inner stripe of outer medulla and the cortex, respectively. Immunohistochemically, SMCT was present at the brush border in S2 and S3 of proximal tubules, suggesting the active uptake of luminal monocarboxylates here. MCT1 and MCT2 immunoreactivities were respectively found baso-laterally in S1 and thick ascending limbs of Henle's loop. The cellular localization of transporters suggests the involvement of SMCT in the uptake of filtrated lactate and ketone bodies and that of MCTs in the transport of monocarboxylate metabolites between tubular cells and circulation, but the different distribution patterns do not support the notion of a functional linkage between SMCT and MCT1/MCT2.