

ニューロンとアストロサイトの代謝的特徴と両細胞間の代謝的交流：¹³C-化合物を用いた初代培養細胞による研究

金松知幸¹, 中嶋一行²

¹創価大学工学部環境共生工学科 ²同生命情報工学科

はじめに

中枢神経系はニューロンとグリアから形成されており、グリアはアストロサイト、オリゴデンドロサイトとミクログリアからなる。これらグリアは、記憶や学習などの脳の高次機能に深く関与しており、精神神経疾患との関連性も指摘されている^{1)~5)}。特にアストロサイトは、毛細血管とニューロンの間に存在し、血液脳関門の形成やニューロンへのエネルギー源の供給役を担ったり、あるいはニューロンが形成するシナプス部周囲に存在し、シナプス部で放出される神経伝達物質の取り込みや不活性化に関与したりすることが知られている^{6)~8)}。一方、ミクログリアは従来、中枢神経系において免疫担当細胞の役割を担っていると考えられていたが、近年、多くの脳機能と関連していることが報告されている⁹⁾。

脳機能はこれらニューロンとグリア（アストロサイト）の代謝、特に両細胞間の代謝的交流によって維持されていると考えられている。両細胞間の代謝的交流の実態を明らかにするために、安定同位体である¹³Cでラベルされた各種化合物を用いて、*in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*での研

究がなされてきている。その結果、ニューロンから放出された神経伝達物質であるグルタミン酸はアストロサイトに取り込まれた後、そこでグルタミンにされる。そしてアストロサイトから放出されたグルタミンはニューロンへ取り込まれ、再びグルタミン酸にされ^{10)~15)}、 γ -アミノ酪酸（GABA）の前駆体としても利用される^{16)~19)}、ことなどが報告されている。また、ニューロン活動時に、乳酸—アストロサイトで解糖系によってグルコースから生成された—がニューロンに供給され、その乳酸がニューロンで好氣的に利用されていることが報告されている^{20),21)}。

今回、初代培養ニューロンとアストロサイトまたは両細胞の共培養系を用いて、培養メディウムに各種¹³C-化合物を添加して行った¹³C-NMRの実験結果と最近の知見をもとに、ニューロンとアストロサイトの代謝的特徴について総括した。

¹³C-化合物と¹³C-NMRスペクトル法

安定同位体である¹³Cは天然存在比が、¹Hのほぼ100%に対して、1.1%であり、核種に

この総説は、第41回日本磁気共鳴医学会大会シンポジウム3「分子イメージングにおけるBreakthrough」での講演を中心にまとめたものである。

キーワード ¹³C-compound, primary cultured neuronal cell, primary cultured astrocytic cell, metabolic trafficking, analytical nuclear magnetic resonance

よる感度も, ^1H を 1 としたとき ^{13}C のそれは 0.016 と極端に低く, NMR の観測核種としては利用し難い. しかし, この様な特性は, 化合物の炭素の ^{13}C atom% を 99% 近くまで上げることにより ^{13}C をトレーサーとして利用することができることを意味しており, その化合物の代謝動態を ^{13}C -NMR 測定によって追うことができる. そこで, 今回, 初代培養神経系細胞を用いて, メディウムに $[1,6-^{13}\text{C}]$ -グルコース, $[4-^{13}\text{C}]$ -グルタミンまたは $[3-^{13}\text{C}]$ -乳酸をそれぞれ添加し (いずれも ^{13}C の atom% は 99%), 数時間培養を行った後, メディウムと細胞を分離し, それぞれを分析用 NMR で ^{13}C -スペクトル測定を行った. ^{13}C -化合物が細胞内で代謝された場合の, ^{13}C の動態を Fig. 1 に示した. 初代培養ニューロンには Modified Eagle's Medium ; MEM) を用い, 初代培養アストロサイトには Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; D-

MEM) を用いた. グルコースが含まれていない MEM が市販されていないため, MEM 用ビタミン溶液と MEM 用アミノ酸溶液を購入し, それに無機塩類を加え, グルコースフリーのメディウムを作製し, $[1,6-^{13}\text{C}]$ -グルコースを添加する実験に用いた.

初代培養ニューロンのメディウムに $[1,6-^{13}\text{C}]$ -グルコースを添加し, 6 時間後に細胞より得た抽出画分の ^{13}C -NMR スペクトロスコピーの結果を Fig. 2A, B に示した. スペクトル図の各ピークの面積を求め, 外標である TSP (トリメチルシリルプロピオネイト) の面積に対する相対値から, 各ピークのもル数を求めた. $[1-^{13}\text{C}]$ -グルコースを用いた場合, 解糖系によって 2 分子のピルビン酸が産生されるとき, $[3-^{13}\text{C}]$ -ピルビン酸の 3 位炭素の atom% は約 50% となるのに対して, $[1,6-^{13}\text{C}]$ -グルコースを用いた場合, $[3-^{13}\text{C}]$ -ピルビン酸の 3

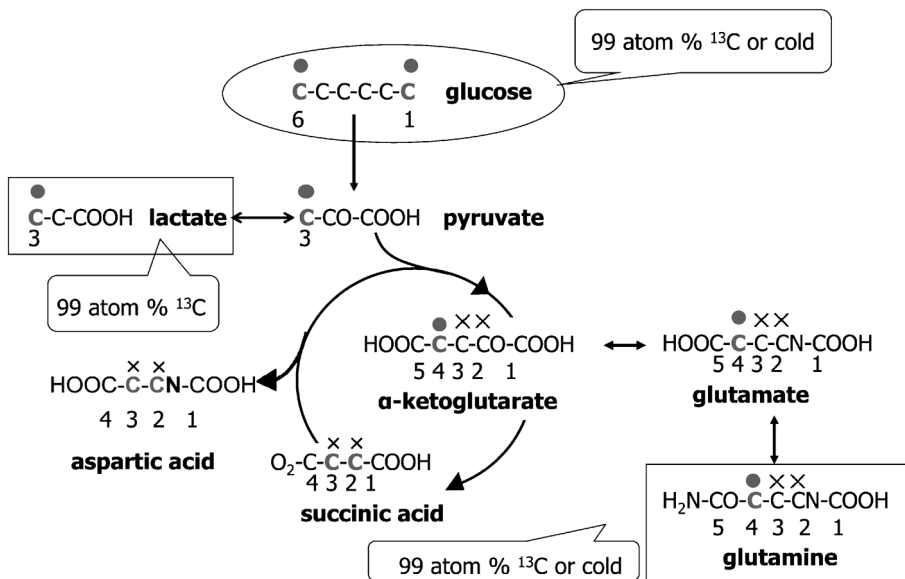


Fig. 1. A simplified scheme of the TCA cycle metabolism of $[1,6-^{13}\text{C}]$ -glucose. ● represents ^{13}C and × represents ^{13}C labeled from second turns of the TCA cycle. The numbers show the positions of carbon.

2014 年 9 月 6 日受理

別刷請求先 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236 創価大学工学部環境共生工学科 金松知幸

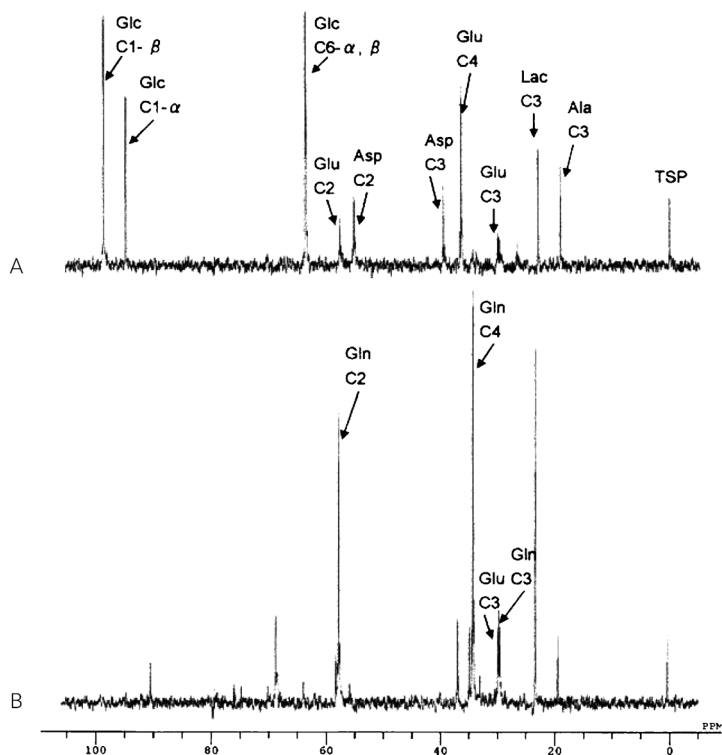


Fig. 2. ¹³C-NMR spectra of cell extracts from rat primary cultured neurons (A) and astrocytes (B) after 6 h incubation with 5.5 mM [1,6-¹³C]-glucose and 4.0 mM glutamine and without lactate. TSP, 3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-^d₄ acid sodium salt; Ala, alanine; Lac, lactate; Glu, glutamate; Gln, glutamine; Asp, aspartate; Glc, glucose.

位炭素の atom% は約 100% となることから、ピルビン酸を介したグルコース由来の代謝産物を ¹³C-NMR 測定するとき、検出感度が 2 倍になる。

初代培養神経系細胞種の違いによるグルコース、グルタミンまたは乳酸代謝の違い

グルコース 5.5 mM を [1,6-¹³C]-グルコースで (メディウム A)、グルタミン 4.0 mM を [4-¹³C]-グルタミンで (メディウム B) それぞれ置き換えたもの、グルコースの代わりに [3-¹³C]-乳酸 11 mM を加えたもの (メディウム C)、の三種のメディウム (Table 1) でニュー

Table 1. Composition of ¹³C-labeled substance in culture medium

Medium	Glucose 5.6 mM	Glutamine 4.0 mM	Lactate 11 mM
A	[1,6- ¹³ C]	Cold	—
B	Cold	[4- ¹³ C]	—
C	—	Cold	[3- ¹³ C]

When [3-¹³C]-lactate was added to the medium, glucose was removed.

ロンとアストロサイトを、それぞれ 6 時間培養した後にメディウム中に残存している ¹³C-化合物の量より、ニューロンとアストロサイトの各 ¹³C-化合物の消費量を求めた。その結果、グ

Table 2. Neuronal and astrocytic consumption of glucose, glutamine or lactate added in medium

	Glucose (5.5 mM)	Glutamine (4.0 mM)	Lactate (11 mM)
Neurons (n=5)	31.2 ± 7.3	55.4 ± 34.8	101 ± 30
Astrocytes (n=5)	192 ± 19*	19.3 ± 9.2*	62.2 ± 20*

(μmol/mg-protein/h)

Data are expressed as mean ± SD (n=5). Statistically significant differences compared with neurons are expressed as * $P < 0.01$

ルコース (メディウム中濃度 5.5 mM) においては, アストロサイトが $192 \pm 19 \mu\text{mol/mg-protein/h}$ でニューロンが $31.2 \pm 7.3 \mu\text{mol/mg-protein/h}$ であった. グルタミン (メディウム中濃度 4 mM) においては, ニューロンが $55.4 \pm 34.8 \mu\text{mol/mg-protein/h}$ でアストロサイトが $19.3 \pm 9.2 \mu\text{mol/mg-protein/h}$ であった. また, 乳酸 (メディウム中濃度 11 mM) においては, ニューロンが $101 \pm 30 \mu\text{mol/mg-protein/h}$ でアストロサイトが $62.2 \pm 20 \mu\text{mol/mg-protein/h}$ であった (いずれも $n = 5$). これらの結果から, アストロサイトでグルコースが乳酸やグルタミンよりも, また, ニューロンでは乳酸とグルタミンがグルコースよりも消費量が多いことが明らかとなった (Table 2).

細胞に取り込まれた各 ^{13}C -化合物の 細胞内代謝

1. グルコース代謝

[1,6- ^{13}C]-グルコース (メディウム A) がニューロンで代謝されると (Fig. 2A), アラニンの 3 位, グルタミン酸の 4 位, アスパラギン酸の 2 位と 3 位にそれぞれグルコース由来の ^{13}C が取り込まれていた. 更に, グルタミン酸の 2 位と 3 位にも ^{13}C が認められ, TCA 回路の 2 巡目の α -ケトグルタレートよりグルタミン酸が合成されていることが明らかとなっ

た. しかし, グルタミンのピークはニューロンでは全く認められなかった. [1,6- ^{13}C]-グルコースがアストロサイトで代謝されると (Fig. 2B), グルタミン酸の 4 位にはわずかしがグルコース由来の ^{13}C が取り込まれていないにもかかわらず, グルタミンの 4 位に著しい取り込みが認められ, 更に TCA 回路の 2 巡目によりグルタミンの 2 位と 3 位にも認められた. また, TCA 回路の 2 巡目によりグルタミンの 2 位と 3 位に ^{13}C が取り込まれた場合, 2 位と 3 位のピーク面積は等しくなるはずであるが, アストロサイトでは 2 位が 3 位よりもはるかに大きい面積を示した. これは, ビルビン酸カルボキシラーゼ ([3- ^{13}C]-ビルビン酸に炭素が固定され [2- ^{13}C]-オキザロ酢酸が合成される) がアストロサイトに局在している結果を示しているものと思われる²²⁾. また, 乳酸の 3 位のピーク面積はアストロサイトでニューロンに比べ高い値を示した.

2. グルタミン代謝

[4- ^{13}C]-グルタミン (メディウム B) がニューロンに取り込まれると, まずグルタミン酸にされ, α -ケトグルタレートを介して TCA 回路に入り, オキザロ酢酸を経てアスパラギン酸に変換されていることが示された. また, TCA 回路の 2 巡目で合成されたグルタミン酸の 2 位, 3 位が確認され (Fig. 3A), ニューロンではグルタミンが代謝利用されていることが示された. 一方, アストロサイトではグルタミンが明確に認められるものの, グルタミンの代謝産物は, わずかなグルタミン酸を除いてまったく認められず (Fig. 3B), アストロサイトにおいては, グルタミンはほとんど代謝利用されないことが示された.

3. 乳酸代謝

[3- ^{13}C]-乳酸が (メディウム C) ニューロンに取り込まれると, グルタミン酸, アスパラギン酸やアラニンに乳酸由来の ^{13}C が取り込まれており (Fig. 4A), アストロサイトではグルタミン ([4- ^{13}C]) の合成が優性であったが, グ

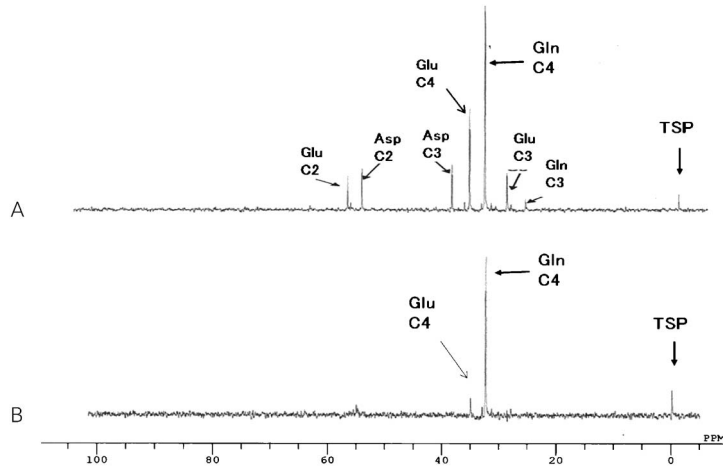


Fig. 3. ^{13}C -NMR spectra of cell extracts from rat primary cultured neurons (A) and astrocytes (B) after 6 h incubation with 5.5 mM glucose and 4.0 mM $[4\text{-}^{13}\text{C}]$ -glutamine and without lactate. TSP, 3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3- d_4 acid sodium salt ; Gln, glutamine ; Glu, glutamate ; Asp, aspartate ; Glc, glucose.

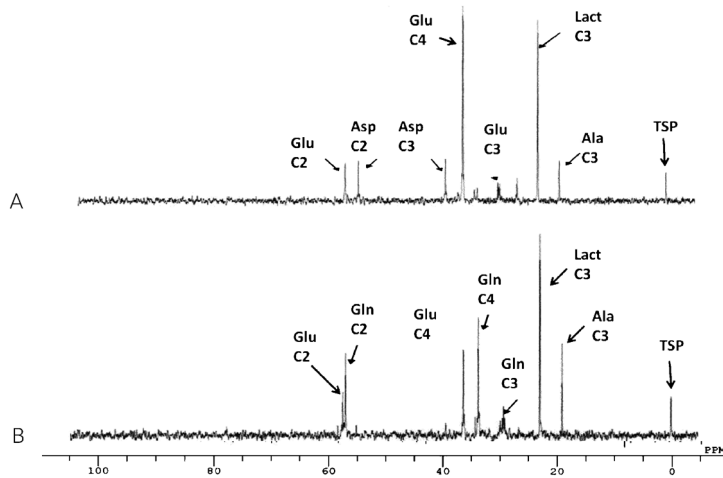


Fig. 4. ^{13}C -NMR spectra of cell extracts from rat primary cultured neurons (A) and astrocytes (B) after 6 h incubation with 4.0 mM glutamine and 11 mM $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ -lactate and without glucose. TSP, 3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3- d_4 acid sodium salt ; Ala, alanine ; Lac, lactate ; Glu, glutamate ; Gln, glutamine ; Asp, aspartate ; Glc, glucose.

ルタミン酸 ([4-¹³C]) もグルタミンの 70% 近い面積を示した (Fig. 4B). ニューロン, アストロサイトともに, メディウムに [1,6-¹³C]-グルコースを添加した場合も [3-¹³C]-乳酸を添加した場合も, TCA 回路より生成される代謝物への ¹³C のディストリビューションパターンは同じになるはずであるが (細胞内に取り込まれた乳酸がピルビン酸, アセチル CoA を介して TCA 回路に入るの), 両者 (Fig. 2 と Fig. 4) とともにそのパターンは異なっており, その現象がなぜ生じるのか興味深い. Bouzier-Sore AK 等^{23),24)}は, [1-¹³C]-グルコース+乳酸またはグルコース+[3-¹³C]-乳酸をそれぞれ 1.1 mM 含むメディウムでニューロンとアストロサイトを培養し, 両細胞におけるグルコースと乳酸の代謝がそれぞれ異なっていること, アストロサイトではグルコースからのグルタミンとアラニンの合成が活発であり, グルコースが乳酸より酸化的代謝のよい基質となること, ニューロンでは乳酸からのグルタミン酸合成が活発であり, 乳酸をグルコースより酸化的エネルギー基質としていることを報告している.

NMR 測定を行うときに, NMR 細管内に外標である TSP (14.5 μ mol) を加え, その TSP の面積に対する各位炭素の相対面積より, 各アミノ酸の各位の炭素へ取り込まれた ¹³C 量を μ mol で求め, /mg-protein/h で, Table 3 に示した. 表中の薄灰色の数値は, 細胞内に認められたメディウムに添加した ¹³C-化合物である.

メディウム中に認められる, 添加した ¹³C-グルコース以外の ¹³C-化合物

メディウム中に [1,6-¹³C]-グルコースを添加して 4 時間培養した後のメディウムには, [3-¹³C]-乳酸のみが確認でき, その量はニューロンで $50.6 \pm 23.3 \mu$ mol/mg-protein/h で, アストロサイトで $169 \pm 29 \mu$ mol/mg-protein/h であり (n=3, P<0.001), アストロサイトでのグルコース由来の乳酸生成が有意に高いことが示された. Bouzier-Sore AK 等^{23),24)}は, アストロサイトでは, グルコースより合成される物質の主なものが乳酸であること, ニューロンは乳酸をより消費することから, アストロサイト

Table 3. ¹³C enrichments in individual carbon positions of glutamate, glutamine, aspartate, alanine and lactate

		Neurons			Astrocytes		
		[1,6- ¹³ C]-glucose (5.5 mM)	[4- ¹³ C]-glutamine (4.0 mM)	[3- ¹³ C]-lactate (11 mM)	[1,6- ¹³ C]-glucose (5.5 mM)	[4- ¹³ C]-glutamine (4.0 mM)	[3- ¹³ C]-lactate (11 mM)
Glutamate	C3	0.179 \pm 0.081	0.425	0.421 \pm 0.209	0.022 \pm 0.033	N.D.	0.492 \pm 0.368
	C4	0.476 \pm 0.113	1.41	2.47 \pm 1.39	0.237 \pm 0.193	0.166	0.993 \pm 0.468
	C2	0.164 \pm 0.035	0.415	0.398 \pm 0.199	0.106 \pm 0.059	N.D.	0.381 \pm 0.183
Glutamine	C3	N.D.	N.D.	N.D.	0.297 \pm 0.055	N.D.	0.881 \pm 0.512
	C4	N.D.	3.31	N.D.	0.612 \pm 0.138	1.55	1.32 \pm 0.82
	C2	N.D.	N.D.	N.D.	0.464 \pm 0.123	N.D.	0.718 \pm 0.375
Aspartate	C3	0.175 \pm 0.097	0.601	0.456 \pm 0.334	0.024 \pm 0.037	N.D.	0.179 \pm 0.134
	C2	0.204 \pm 0.120	0.577	0.372 \pm 0.292	0.026 \pm 0.035	N.D.	0.107 \pm 0.078
Alanine	C3	0.181 \pm 0.062	N.D.	0.473 \pm 0.304	0.301 \pm 0.199	N.D.	0.663 \pm 0.339
Lactate	C3	0.185 \pm 0.095	N.D.	3.90 \pm 1.08	0.396 \pm 0.229	N.D.	3.37 \pm 2.61

¹³C-label incorporation into individual carbon positions of glutamate, glutamine, aspartate, alanine and lactate in neurons and astrocytes from [1,6-¹³C]-glucose, [4-¹³C]-glutamine or [3-¹³C]-lactate. ■ Represents [4-¹³C]-glutamine or [3-¹³C]-lactate incorporated into cells from medium.

が合成した乳酸がニューロンで、たとえ *in vivo* での静止 (resting) 状態でも、利用されていると推測している。

ニューロンは細胞外にグルタミン酸を放出していることが知られているが、今回の我々の実験では、[4-¹³C]-グルタミン酸は細胞内に認められたもののメディウム中には認められなかった。一方、メディウム中に [4-¹³C]-グルタミンまたは [3-¹³C]-乳酸を添加した場合、添加化合物以外の ¹³C ピークはほとんど認められなかった。細胞内代謝によって産生された物質の細胞外への放出量が、乳酸を例外に、¹³C-NMR 測定感度以下であるために、検出されていないものと思われる。

Sonnewald U 等²⁵⁾は初代培養アストロサイトとニューロンをサンドイッチ共培養し(培養容器の底面にアストロサイトをフルシート状にし、その上にニューロンを播種する)、メディウムに [1-¹³C]-グルコースと [2-¹³C]-アセテートを加え、グルタミン合成酵素阻害剤を添加した場合と、しない場合で培養を行った。その後、細胞除タンパク質画分を ¹³C-NMR 測定と GC-MS 測定を行い、アストロサイトでしか代謝利用されないアセテート^{25),26)}の ¹³C が、グルタミン合成酵素阻害剤がメディウム中に存在しないときには、 γ -アミノ酪酸に取り込まれるのに対して、グルタミン合成酵素阻害剤が存在すると、その ¹³C の取り込みが抑制されることから、アストロサイトで合成されたグルタミンがニューロンに移行し、そこで、 γ -アミノ酪酸の前駆体として利用されることを報告している。しかし、アセテートがアストロサイトのみで代謝されるという仮定に対しては、反論もある²⁷⁾。

ニューロンとアストロサイトの共培養による細胞内グルコース代謝物の変化

ニューロンとアストロサイトの代謝的交流を調べるためにトランスウェル (Transwell) を

用いて実験を行った。容器中層にメッシュ状の膜を入れ、その膜の上にアストロサイトを播種しフルシートになった所で、そのメッシュを、底面にニューロンが播種されフルシート状になっている培養容器の中層に移し、メディウムのグルコースを [1,6-¹³C]-グルコースへ交換し、4 時間培養を行った。その後、両細胞を別々に回収し、¹³C-NMR 測定を行った (Fig. 5)。その結果、共培養を行うことによって、ニューロン単独培養では見られなかった [4-¹³C]-グルタミンのピークが確認された。ニューロンにはグルタミン酸からグルタミンを合成する酵素—グルタミン合成酵素—が存在しないことが知られていることから、ニューロンで認められた [4-¹³C]-グルタミンはアストロサイトで合成されたものがメディウムを介して移行したものであると思われる。また、ニューロン単独培養の場合、細胞内の [3-¹³C]-乳酸量は $0.166 \pm 0.049 \mu\text{mol} / \text{mg-protein} / \text{h}$ であったが、共培養の場合、 $0.734 \pm 0.280 \mu\text{mol} / \text{mg-protein} / \text{h}$ であり、共培養によってニューロン内の乳酸量が有意に増加していた ($n=5, P < 0.002$)。しかし、この増加がニューロンでの乳酸生成が促進された結果か、アストロサイトによって生成された乳酸がメディウムを介してニューロンへ取り込まれた結果かは不明である。一方、アストロサイトの細胞内においても乳酸量は有意に増加していた (単独培養で $0.240 \pm 0.077 \mu\text{mol} / \text{mg-protein} / \text{h}$ あるのに対して共培養で $0.529 \pm 0.205 \mu\text{mol} / \text{mg-protein} / \text{h}$, $n=5, P < 0.05$)。

ニューロンとアストロサイトの共培養によるメディウム乳酸量の変化

ニューロンとアストロサイトの共培養によってメディウム中の乳酸量が、それぞれの細胞の単独培養 (ニューロン単独で $50.6 \pm 23.2 \mu\text{mol} / \text{mg-protein} / \text{h}$, アストロサイト単独で $169 \pm 29 \mu\text{mol} / \text{mg-protein} / \text{h}$) に比べて有意に増加

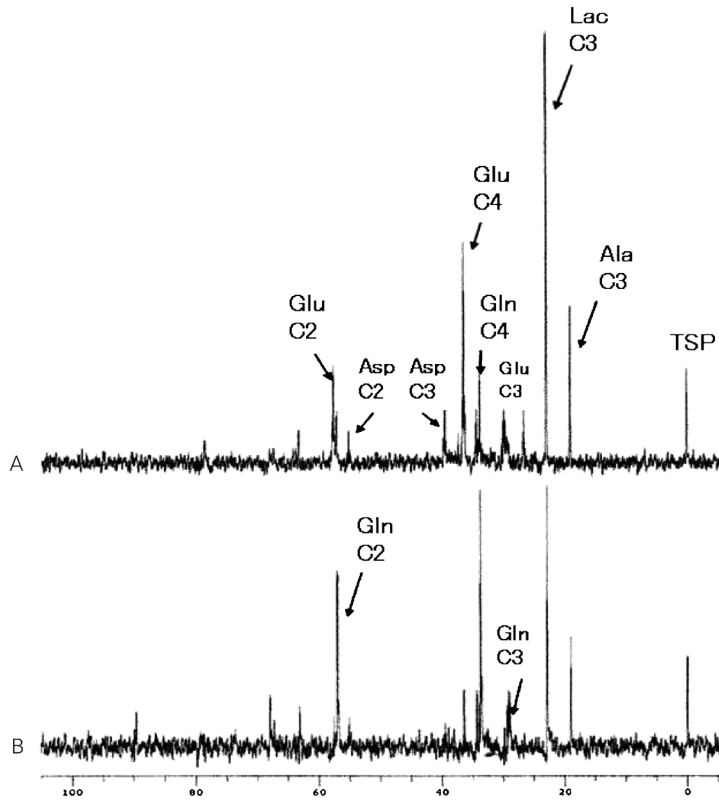


Fig. 5. ^{13}C -NMR spectra of cocultured cell extracts from neurons (A) and astrocytes (B) after 4 h incubation with 5.5 mM $[1,6\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucose and 4.0 mM glutamine and without lactate. Cocultures were incubated by Traswell[®]. Neurons were cultivated on the bottom of culture vessel and astrocytes were cultivated on the mesh located middle of culture vessel. After cocultured, neurons and astrocytes were separately harvested. TSP, 3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3- d_4 acid sodium salt; Ala, alanine; Lac, lactate; Glu, glutamate; Gln, glutamine; Asp, aspartate; Glc, glucose.

($208 \pm 15 \mu\text{mol}/\text{mg}\text{-protein}/n=6$, ニューロン vs 共培養; $P < 0.001$, アストロサイト vs 共培養; $P = 0.015$) していた。

アストロサイトの乳酸生成を促進する因子について

ニューロンとアストロサイトの共培養によってメディアム中の乳酸量が、それぞれの細胞の単独培養より増加していることから、アストロ

サイトの乳酸生成に影響を与えるニューロン由来の液性因子の存在の有無を検討した。ニューロンを24時間培養したメディアム (NCM) を、 $[1,6\text{-}^{13}\text{C}]$ -グルコースを含むアストロサイトのメディアムに加え (NCMの最終濃度は10%)、6時間培養した後にメディアム中の乳酸量を測定した。一方、グルタミン酸がアストロサイトの乳酸生成を促進するとの報告があることから、アストロサイトのメディアムに $[1,6\text{-}^{13}\text{C}]$ -グルコースと同時に 10, 40, 200 μM

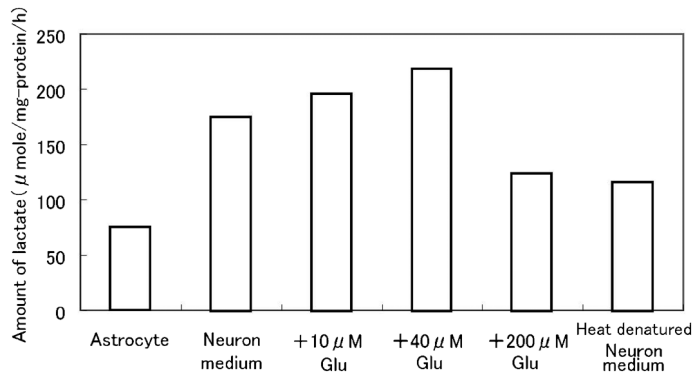


Fig. 6. Amount of ¹³C-labeled lactate synthesized from [1,6-¹³C]-glucose and released in the medium by astrocytes. Astrocytes were incubated with medium containing neuron medium (that was used for 12 h incubation of neurons. Final percentage of neuron medium was 10%), heat denatured that medium or 10, 40, 200 μM glutamate. Amount of lactate are expressed as μmole/mg-protein/h. The values are means of two experiments.

のグルタミン酸を添加して、6時間培養し、メディアム中の乳酸量を測定した (Fig. 6). アストロサイトのメディアムに NCM を加えると、メディアム中の乳酸量は、NCM の添加がないときに比べ、約 2.3 倍に増加しており、その値はメディアムに 10~40 μM のグルタミン酸を添加したときに等しかった。このことから、ニューロンから放出されたグルタミン酸が NCM 中にあり、それがアストロサイトの乳酸生成を促進していると考えられるが、熱処理 (80°C, 10 分) を施した NCM をアストロサイトのメディアムに添加すると、熱処理をしていない場合に比べ促進効果は半減していた。この結果は、NCM 中に含まれるアストロサイトの乳酸生成を促進する因子に熱不安定物質 (グルタミン酸以外) が含まれていることを意味しており、非常に興味深い。

Fig. 7 に、グルタミン酸作動性ニューロシナプス部位で行われていると考えられるニューロンとアストロサイト間での代謝的交流 (metabolic trafficking) を模式的に示した。アストロサイトに局在する酵素として、ピルビン酸カルボキシラーゼ (pyruvate carboxylase,

PC), グルタミン合成酵素 (glutamine synthetase, GS), 乳酸脱水素酵素 5 型 (lactate dehydrogenase-5, LDH-5) それにグリコーゲン合成酵素 (glycogen synthetase) があり、ニューロンに局在する酵素として、グルタミン分解酵素 (glutaminase) や乳酸脱水素酵素 1 型がある。また、輸送体としては、アストロサイトに局在するものとしてグルコース輸送体 1 型 (glucose transporter-1, GLUT1), グルタミン酸・アスパラギン酸輸送体:興奮性アミノ酸輸送体 1 型 (excitatory amino acid transporter 1, EAAT1: glutamate-aspartate transporter, GLAST), グルタミン酸輸送体 1 型:興奮性アミノ酸輸送体 2 型 (glutamate transporter:excitatory amino acid transporter 2, EAAT2), モノカルボン酸輸送体 1 型 (monocarboxylic acid transporter 1) それにモノカルボン酸輸送体 4 型 (monocarboxylic acid transporter 4) があり、ニューロンに局在するものとして、グルタミン輸送体 (glutamine transporter, GlnT), 興奮性アミノ酸輸送体 3 型 (excitatory amino acid transporter 3, EAAT3), 興奮性アミノ酸輸送体 4 型 (ex-

citatory amino acid transporter 4, EAAT4) が存在している。

グルタミン酸作動性ニューロンの活動時にプレシナプティックにグルタミン酸が、シナプス間隙に放出される。シナプス間隙のグルタミン酸は GLT1 または GLAST によってアストロサイトに取り込まれるが、その時、共役反応として Na^+ が取り込まれ、アストロサイト内の Na^+ が増加することにより Na^+/K^+ -ATPase が活性化される。その結果、解糖系でのグルコースの消費や LDH-5 による乳酸生成が増加

する。アストロサイトで促進合成された乳酸は MCT1 や MCT4 を介してアストロサイトより細胞間隙に放出され、その後、MCT2 を介してニューロンに取り込まれ LDH-1 によってピルビン酸にされ、ニューロンの TCA 回路にて消費され、エネルギー源として利用される。(アストロサイト-ニューロン乳酸シャトル説)。一方、ニューロンより放出されアストロサイトに取り込まれたグルタミン酸は、グルタミン合成酵素によりグルタミンにされる。アストロサイトより細胞間へ流出したグルタミン

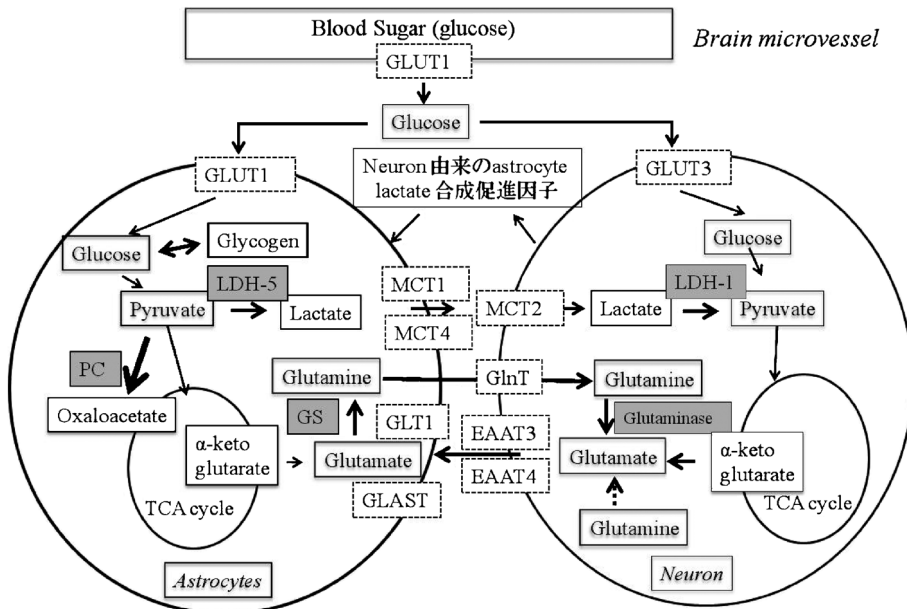


Fig. 7. Schematic representation of metabolic coupling hypothesis between neurons and astrocytes during glutamatergic neurotransmission. ■ represents enzyme, □ represents transporter. At glutamatergic synapses, presynaptically released glutamate via EAAT3 and/or EAAT4 depolarizes postsynaptic neurons. The action of glutamate is terminated by a glutamate uptake system located in astrocytes via GLT1 (EAAT2) and/or GLAST (EAAT1). In astrocytes, glutamate is converted into glutamine by glutamine synthetase (GS) and glutamine is released from astrocytes and transported into neurons via GlnT. In neurons, glutamine is hydrolyzed to glutamate by glutaminase, and glutamate is released from neurons to synaptic cleft as a neurotransmitter. Glucose transported into astrocytes from brain microvessels via GLUT1 is processed glycolytically to pyruvate, and pyruvate is converted to lactate by LDH5. Astrocytic lactate is released to extracellular space via MCT1 and/or MCT4, and transported into neurons via MCT2. In neurons, lactate is converted to pyruvate by LDH1, and pyruvate is used as a substrate of oxidative phosphorylation in mitochondria.

は、グルタミン輸送体によりニューロンに取り込まれ、グルタミン分解酵素によってグルタミン酸になり、再度、神経伝達物質として利用される（ニューロン/アストロサイト-グルタミン酸/グルタミンサイクル説）²⁸⁾。

また、我々の実験より、ニューロンはアストロサイトの乳酸生成を促進する因子を細胞外に放出しており、その因子の少なくとも一つはグルタミン酸以外の熱により変性する因子であることが示唆された。

ま と め

脳はニューロンと三種類のグリアからなるヘテロジナスな組織であり、それぞれのタイプの細胞が独自に機能を担うと同時に、各タイプの細胞間で代謝物のやりとり（metabolic trafficking）が行われたり、細胞間をイオンが移動したり、シグナル伝達物質を介して情報のやりとりが行われるなど、種々の方法でお互いが作用しあっている。また、脳微小血管とアストロサイト間の物質移動、それを調節するシステムなどがあり、それらが複雑に作用しあって始めて脳の高次機能が維持されていることは明かである。それら複雑なシステムのメカニズムを解明することは不可能に近いと思われるが、まず、最初の一步としてニューロンとアストロサイトの各細胞を単独で培養し、それぞれの細胞の代謝的特徴を知ることは重要である。それらの結果が、複雑な脳にどこまで反映できるかは不明であるが、脳機能のある一面を知りたいという好奇心の結果は、多くの論文、総説としてまとめられている。Fig. 7 に示すように、脳の物質代謝動態には多くの酵素、輸送体それに受容体が関与しており、脳機能疾患はそれら複雑な物質代謝交流の異常の結果生じているのかもしれない。今後、*in vitro*, *ex vitro* での ¹³C-化合物を用いた研究による知識の蓄積とともに、*in vivo*（非侵襲的）での ¹³C-(N)MR スペクトルスコピーによる代謝研究が進展し、最終的に

は ¹³C-MR イメージングが可能になることを期待している。

文 献

- 1) Pereira A Jr, Furlan FA : Astrocytes and human cognition : modeling information integration and modulation of neuronal activity. *Prog Neurobiol* 2010 ; 92 : 405-420
- 2) Ben Achour S, Pascual O : Glia : the many ways to modulate synaptic plasticity. *Neurochem Int* 2010 ; 57 : 440-445
- 3) Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M : Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol* 2011 ; 39 : 115 - 123. doi : 10.1177 / 0192623310385254
- 4) Ota Y, Zanetti AT, Hallock RM : The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. *Neural Plast* 2013 ; 185463. doi : 10.1155/2013/185463
- 5) Sheridan GK, Murphy KJ : Neuron-glia crosstalk in health and disease : fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biol.* 2013 ; 3 : 130181. doi : 10.1098/rsob.130181
- 6) Wolff JR : The astrocyte as link between capillary and nerve cell. *Triangle* 1970 ; 9 : 153-164
- 7) Vise WM, Liss L, Yashon D, Hunt WE : Astrocytic processes : A route between vessels and neurons following blood-brain barrier injurt. *J Neuropathol Exp Neurol* 1975 ; 34 : 324-334
- 8) Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, Tanaka K, Niwa M : A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 2009 ; 54 : 253-263
- 9) Morris GP, Clark IA, Zinn R, Vissel B : Microglia : a new frontier for synaptic plasticity, learning and memory, and neurodegenerative disease research. *Neurobiol Learn Mem* 2013 ; 105 : 40-53. doi : 10.1016/j.nlm.2013.07.002
- 10) Westergaard N, Sonnewald U, Schousboe A : Metabolic trafficking between neurons and astrocytes : the glutamate/glutamine cycle revisited. *Dev Neurosci* 1995 ; 17 : 203-211

- 11) Shank RP, Campbell GL : Glutamine and alpha-ketoglutarate uptake and metabolism by nerve terminal enriched material from mouse cerebellum. *Neurochem Res* 1982 ; 7 : 601-616
- 12) Schousboe A, Westergaard N, Sonnewald U, Petersen SB, Huang R, Peng L, Hertz L : Glutamate and glutamine metabolism and compartmentation in astrocytes. *Dev Neurosci* 1993 ; 15 : 359-366
- 13) Westergaard N, Sonnewald U, Schousboe A : Metabolic trafficking between neurons and astrocytes : the glutamate/glutamine cycle revisited. *Dev Neurosci* 1995 ; 17 : 203-211
- 14) Sibson NR, Dhankhar A, Mason GF, Behar KL, Rothman DL, Shulman RG : *In vivo* ¹³C NMR measurements of cerebral glutamine synthesis as evidence for glutamate-glutamine cycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 2699-704
- 15) Bröer S, Brookes N : Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem* 2001 ; 77 : 705-719
- 16) Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A, Svendsen JS, Unsgård G, Petersen SB : Direct demonstration by [¹³C]NMR spectroscopy that glutamine from astrocytes is a precursor for GABA synthesis in neurons. *Neurochem Int* 1993 ; 22 : 19-29
- 17) Pascual JM, Carceller F, Roda JM, Cerdán S : Glutamate, glutamine, and GABA as substrates for the neuronal and glial compartments after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1998 ; 29 : 1048-56
- 18) Rae C, Hare N, Bubb WA, McEwan SR, Bröer A, McQuillan JA, Balcar VJ, Conigrave AD, Bröer S : Inhibition of glutamine transport depletes glutamate and GABA neurotransmitter pools : further evidence for metabolic compartmentation. *J Neurochem* 2003 ; 85 : 503-14
- 19) Sonnewald U, White LR, Odegård E, Westergaard N, Bakken IJ, Aasly J, Unsgård G, Schousboe A : MRS study of glutamate metabolism in cultured neurons/glia. *Neurochem Res* 1996 ; 2 : 987-993
- 20) Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG : Energy on demand. *Science* 1999 ; 283 : 496-497
- 21) Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, Stella N, Magistretti PJ : Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci* 1998 ; 20 : 291-299
- 22) Kanamatsu T, Tsukada Y : Effects of ammonia on the anaplerotic pathway and amino acid metabolism in the brain : an *ex vivo* ¹³C NMR spectroscopic study of rats after administering [2-¹³C] glucose with or without ammonium acetate. *Brain Res* 1999 ; 841 : 11-19
- 23) Bouzier-Sore AK, Voisin P, Bouchaud V, Bezancon E, Franconi JM, Pellerin L : Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes : a comparative NMR study. *Eur J Neurosci* 2006 ; 24 : 1687-1694
- 24) Bouzier-Sore AK, Voisin P, Canioni P, Magistretti PJ, Pellerin L : Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003 ; 23 : 1298-1306
- 25) Sonnewald U, Westergaard N, Schousboe A, Svendsen JS, Unsgård G, Petersen SB : Direct demonstration by [¹³C]NMR spectroscopy that glutamine from astrocytes is a precursor for GABA synthesis in neurons. *Neurochem Int* 1993 ; 22 : 19-29
- 26) Hassel B, Sonnewald U, Fonnum F : Glial-neuronal interactions as studied by cerebral metabolism of [2-¹³C]acetate and [1-¹³C]glucose : an *ex vivo* ¹³C NMR spectroscopic study. *J Neurochem* 1995 ; 64 : 2773-2782
- 27) Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D : Metabolism of acetate in rat brain neurons, astrocytes and cocultures : metabolic interactions between neurons and glia cells, monitored by NMR spectroscopy. *Cell Mol Biol* 1997 ; 43 : 645-657
- 28) Magistretti PJ, Pellerin L : Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999 ; 354 : 1155-1163

Metabolic Traits of, and Trafficking between Neurons and Astrocytes: Applying ¹³C-labeled Compounds to Primary Cultured Neural Cells

Tomoyuki KANAMATSU¹ and Kazuyuki NAKAJIMA²

*Departments of ¹Environmental Engineering for Symbiosis and ²Bioinformatics, Faculty of Engineering,
Soka University
Tangi-machi 1-236, Hachioji-shi, Tokyo 192-8577*

The central nervous system is composed of neurons and 3 types of glial cells: astrocytes, microglia, and oligodendrocytes. Metabolic trafficking between neurons and astrocytes, such as that in the neuron-astrocyte/glutamate-glutamine cycle and the astrocyte-neuron lactate shuttle, is important to maintain brain energy and neurotransmitter metabolism. ¹³C-nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has been used extensively for several decades to elucidate metabolic pathways in cerebral metabolism.

We incubated primary cultured neurons and astrocytes with [1,6-¹³C]-glucose + glutamine, glucose + [4-¹³C]-glutamine, or glutamine + [3-¹³C]-lactate for 6 hours, and incubated a co-culture of both neurons and astrocytes with [1,6-¹³C]-glucose + glutamine for 6 hours. Then we separately obtained cells and culture medium and deproteinized them with 75% ethanol. ¹³C-NMR spectroscopy analysis of medium revealed that neurons and astrocytes consumed glucose in 31.2 ± 7.3 and 192 ± 19 $\mu\text{mol}/\text{mg-protein}/\text{hour}$, glutamine in 54.4 ± 34.8 and 19.3 ± 9.2 $\mu\text{mol}/\text{mg-protein}/\text{hour}$, and lactate in 101 ± 30 and 62.2 $\mu\text{mol}/\text{mg-protein}/\text{hour}$. These data demonstrate the clear preference of lactate and glutamine over glucose for energy metabolism in neurons and of glucose over lactate and glutamine for energy metabolism in astrocytes. The co-culture of both neurons and astrocytes showed the increased concentration of [3-¹³C]-lactate synthesized from [1,6-¹³C]-glucose in medium. The concentration of [3-¹³C]-lactate in the medium increased by the addition of neuronal medium to the astrocyte-cultured medium containing [1,6-¹³C]-glucose. These data may show that neurons synthesize the factors that stimulate astrocytic glycolysis. ¹³C-NMR spectroscopy analysis of primary cultured neural cells revealed the inability of neurons to synthesize glutamine from glucose, and the only slight metabolism by astrocytes of glutamine incorporated into cells from medium.