

論文内容要旨

Involvement of SGLT1 activities in maintaining
oscillatory Cl⁻ currents from mouse submandibular
acinar cells

(マウス顎下腺腺房細胞での振動性 Cl⁻電流の維持に
おける SGLT1 活性の関与)

主指導教員：香西 克之教授

(医系科学研究科 小児歯科学)

副指導教員：谷本 幸太郎教授

(医系科学研究科 矯正歯科学)

副指導教員：光畑 智恵子准教授

(医系科学研究科 小児歯科学)

竹安 美彩

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【緒言】

顎下腺腺房細胞では、副交感神経刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、水分分泌が引き起こされる。この時、腺房細胞の腺腔側に局在する Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネル(TMEM16 A)が活性化され、基底側方膜に局在する $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体(NKCC)を介して細胞内に輸送された Cl^- が、TMEM16 A を介して腺腔側へ分泌され、水分分泌を駆動する。また唾液腺にも発現する Na^+ -グルコース共輸送体(SGLT1)は Na^+ の電気化学的勾配によりグルコースを輸送する二次性能動輸送タンパク質で、グルコースと Na^+ を細胞外から細胞内へ同時輸送する。

糖尿病患者には唾液分泌量の減少が観察され、口腔乾燥が認められる。一方、糖尿病モデル動物において SGLT1 の発現がタンパク質レベルで減少していることが報告されているが、SGLT1 の発現低下や機能不全が唾液分泌に与える影響や、SGLT1 活性が唾液腺からの水分分泌と、それを駆動する Cl^- 分泌にいかに関与するかについては、不明な点が多い。

本研究では、顎下腺腺房細胞のグラミシジン穿孔パッチクランプ解析およびホールセルパッチクランプ解析を行い、副交感神経作動薬である carbachol により誘発される Cl^- 電流に対する SGLT1 阻害薬 phlorizin の効果を調べ、顎下腺からの Cl^- 分泌に SGLT1 活性がいかに関与するかを明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

顎下腺腺房細胞で誘発される Cl^- 電流のグラミシジン穿孔パッチクランプ法による解析

マウスの顎下腺を摘出し、HBSS 溶液中で細切した後、コラゲナーゼ処理を行った。その後、ピペッティングにより腺房を分散させ、メッシュに通して得た顎下腺腺房細胞(20-150 μm 分画)をカバーガラスに接着させた。本カバーガラスを灌流チャンバー内に置き、HBSS で灌流した。

パッチピペット電極(3~10M Ω)に一価の陽イオンを透過するグラミシジン(200 $\mu\text{g/ml}$)を含むピペット溶液(150mM KCl, 10mM HEPES (pH7.4))を入れ、灌流チャンバー内の腺房細胞に接触させた後、ギガ Ω シールを得た。容量性電流の安定化が観察された後、膜電位を K^+ の平衡電位である -80mV に保持し、電圧固定モードで、イオン電流を Axopatch200B を用い測定した。灌流液を HBSS から 0.3mM の carbachol 溶液に置換し、carbachol により誘発されるイオン電流を測定した後、さらに 500mM bumetanide、100 μM phlorizin を添加し、それら薬剤のイオン電流に与える影響を分析した。

顎下腺腺房細胞で誘発される Cl^- 電流のホールセルパッチクランプ法による解析

上述と同様に単離し灌流チャンバーに置いた顎下腺腺房細胞に、ピペット溶液(140mM KCl, 1mM MgCl_2 , 10mM HEPES, 0.5mM EGTA, 10mM glucose, 1mM ATP (pH 7.4))を入れたパッチピペット電極を接触させ、ギガ Ω シールを得た。その後、さらにピペット内を陰圧にし、ピペットと接触する細胞膜部分を破壊し、ホールセル記録モードとした。上述と同様の装置で、膜電位を -80mV に保持し、carbachol により誘発されるイオン電流を測定し、添加薬剤の影響を分析した。

【結果】

グラミシジン穿孔パッチクランプで **carbachol** 刺激を行った場合、またホールセルパッチクランプで **carbachol** 刺激を行った場合の両方で、振動性 **Cl**-電流が確認された。**carbachol** 刺激により認められた **Cl**-電流のオシレーションの大きさを比較すると、グラミシジン穿孔パッチクランプよりもホールセルパッチクランプのほうが大きかった。グラミシジン穿孔パッチクランプで **NKCC** 阻害薬である **bumetanide** を投与すると、**carbachol** により誘発される振動性 **Cl**-電流が消失した。

carbachol 刺激中に **phlorizin** を投与すると、グラミシジン穿孔パッチクランプでは一過的に非振動性内向き電流が観察され、**carbachol** 刺激で生じていた振動性 **Cl**-電流は消失した。ホールセルパッチクランプでは、**phlorizin** の投与により非振動性内向き電流が見られる場合と、一過的に外向き電流が見られたのち非振動性内向き電流が見られる場合があり、振動性 **Cl**-電流の抑制度はグラミシジン穿孔パッチクランプに比べ顕著に低く、消失することはなかった。

【考察】

ホールセルパッチクランプで **carbachol** 刺激により誘発される振動性 **Cl**-電流は、ピペットより供給された **Cl** が **TMEM16A** を通じて流出したもので、**TMEM16A** のチャンネル活性のみを表出している。一方、グラミシジン穿孔パッチクランプでは、グラミシジンが一価の陽イオンのみを透過し **Cl** を透過しないため、ピペットから **Cl** は供給されない。グラミシジン穿孔パッチクランプで **carbachol** 刺激により誘導される振動性 **Cl**-電流は、**bumetanide** 添加により **NKCC** を阻害した際に消失することから、**NKCC** を介して細胞内に流入した **Cl** が **TMEM16A** を介し分泌されたものを表出しており、細胞の分泌現象に近い状態を示している。

グラミシジン穿孔パッチクランプで **phlorizin** を投与した場合、**carbachol** 刺激により誘発される振動性 **Cl**-電流の抑制が生じる。従来の研究結果で **phlorizin** による **SGLT1** 阻害が細胞内 **Ca²⁺** 濃度上昇に影響しないこと、および今回の研究結果においてホールセルパッチクランプよりもグラミシジン穿孔パッチクランプで振動性 **Cl**-電流が **phlorizin** により顕著に抑制されたことから、**phlorizin** は **Ca²⁺** シグナルの下流で、**NKCC** を介し細胞内に取り込まれた **Cl** が **TMEM16A** から流出されるまでの過程に作用している可能性がある。また **SGLT1** 活性が振動性 **Cl**-電流の維持、すなわち **Cl** 分泌の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。