

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	竹安 美彩
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査	教授	岡田 芳幸	印
審査委員	教授	吾郷 由希夫	
審査委員	教授	杉田 誠	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>顎下腺腺房細胞では，副交感神経刺激により細胞内 Ca²⁺濃度が上昇し，水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 Ca²⁺依存性 Cl⁻チャネル (TMEM16A)が活性化され，基底側方膜に局在する Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体(NKCC)を介して細胞内に輸送された Cl⁻が，TMEM16A を介して腺腔側へ分泌され，水分泌を駆動する。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。</p> <p>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。</p> <p>方法として，マウスの顎下腺を摘出し，コラゲナーゼ処理により顎下腺腺房細胞を単離し，グラミシジン穿孔パッチクランプ記録もしくはホールセルパッチクランプ記録を行った。双方の記録モードにおいて-80mV の電圧固定下で，顎下腺腺房細胞から carbachol により誘発されるイオン電流を測定した後，さらに bumetanide や 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。</p> <p>結果として，顎下腺腺房細胞のグラミシジン穿孔パッチクランプとホールセルパッチクランプの両方で，carbachol 刺激により振動性 Cl⁻電流が誘発された。Carbachol で誘発される振動性 Cl⁻電流の振幅を比較すると，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のほうが顕著に小さかった。グラミシジン穿孔パッチクランプ記録において，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。ホールセル</p>			

パッチクランプ記録において carbachol 刺激中に phlorizin を投与すると、carbachol で誘発される振動性 Cl⁻電流のピーク値が有意に減少し、振動性 Cl⁻電流の積分値の変化には有意差はみられなかった。グラミシジン穿孔パッチクランプ記録において、carbachol で誘発される振動性 Cl⁻電流は phlorizin の添加により、ピーク値と積分値ともに有意に減少した。振動性 Cl⁻電流のピーク値の phlorizin による抑制度はホールセルパッチクランプに比べ、グラミシジン穿孔パッチクランプにおいて高い傾向が観察された。

ホールセルパッチクランプで carbachol 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、bumetanide 添加により NKCC を阻害した際に振動性 Cl⁻電流が消失することから、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ことが明らかとなった。ホールセルパッチクランプにおいて phlorizin は振動性 Cl⁻電流のピーク値を減少させることより、TMEM16A 活性が phlorizin 投与により部分的に抑制されることが示唆された。従来の研究結果で phlorizin による SGLT1 阻害が carbachol による細胞内 Ca²⁺濃度上昇を抑制しないこと、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る傾向があることから、phlorizin は TMEM16A の部分的抑制作用に加えて、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、振動性 Cl⁻電流を抑制していることが示唆された。

以上の結果から、本論文は SGLT1 活性が carbachol により誘発される振動性 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示し、副交感神経刺激により誘発される水分分泌の駆動力としてはたらく Cl⁻分泌の機構について新しい知見を得ており、十分な科学的価値を示したと考えられる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。