

氏 名	津 村 剛 彦
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2064 号
学位授与の日付	平 成 11 年 1 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Properties of cAMP dependent Cl channels and volume sensitive Cl channels those are expressed in intestinal epithelium. (小腸上皮に発現している容積感受性ClチャンネルとcAMP依存性Clチャンネルの特性) (主査)
論文調査委員	教 授 野 間 昭 典 教 授 福 田 和 彦 教 授 内 山 卓

### 論 文 内 容 の 要 旨

単離したモルモット小腸上皮、およびヒト小腸培養細胞を用いて小腸上皮に発現している2つのCl<sup>-</sup>チャンネルの特性を検討した。

第1主論文では、モルモット小腸より単離した陰窩パネート細胞においてcAMP (cyclic AMP) 依存性Cl<sup>-</sup>電流が活性化されるかどうかをパッチクランプ全細胞記録法を用いて、またCFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 蛋白が発現しているかどうかを単一細胞RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 法や免疫染色法にて検討した。

dibutyryl cAMPとforskolinのカクテルやVIP (vasoactive intestinal polypeptide) による刺激でCl<sup>-</sup>電流が活性化され、それらの電流は細胞内のATPを取り除くことやprotein kinase A阻害剤により抑制された。

パネート細胞において活性化されたcAMP依存性Cl<sup>-</sup>電流は直線的な電流-電圧曲線を示すこと、陰イオンの選択性がBr<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > I<sup>-</sup> > F<sup>-</sup> ≥ gluconate<sup>-</sup>の順序であること、I<sup>-</sup>により抑制されること、Cl<sup>-</sup>チャンネル阻害剤のであるDIDS (4, 4'-diisothiocyano-2, 2'-disulfonic acid) で抑制されず、DPC (diphenylamine-2-carboxylic acid) で抑制される点等CFTR Cl<sup>-</sup>電流と多くの共通点を持っていたが、そのグリベンクラマイドに対する感受性は低く、また内向き電流は細胞外Cl<sup>-</sup>濃度に依存した不活性化を示すなど異なる特性も持っていた。

RT-PCR法により、陰窩全体からはCFTR mRNAを検出することができたが、単一のパネート細胞からはCFTR mRNAを検出することができなかった。抗CFTR抗体による免疫染色では、陰窩および絨毛にCFTR陽性細胞が散在するのが認められたが、パネート細胞の存在する陰窩底部には認めなかった。

第1主論文をまとめると、モルモットパネート細胞において、CFTR Cl<sup>-</sup>電流類似のcAMP依存性Cl<sup>-</sup>電流が活性化されたが、CFTR蛋白の発現は証明されなかった。

第2主論文においては、ヒト小腸培養細胞、Intestine-407の容積感受性Cl<sup>-</sup>チャンネルの細胞外ヌクレオチドに対する感受性をパッチクランプ全細胞記録法およびシングルチャンネル記録法を用いて検討した。

アデニンヌクレオチドはATP > ADP > AMP > の順に容積感受性Cl<sup>-</sup>全細胞記録電流を有意に抑制した。一方、cAMPは100 μM以上の濃度ですべての電位において電流を増加させたが、cGMPにはその効果はなかった。シングルチャンネルコンダクタンスや開確率もcAMPにより影響を受けなかった。細胞外ATPは30 μM以上の濃度で、Mgと結合しない形で全細胞記録電流の外向き電流をより強く抑制した。細胞外ATPによりシングルチャンネル電流は、プラス電位においてflickeryとなった。第2主論文をまとめると、ヒト小腸培養細胞の容積感受性Cl<sup>-</sup>チャンネルは細胞外cAMPにより電位にかかわらず活性を刺激され、細胞外ATPにより電位に依存して抑制された。

## 論文審査の結果の要旨

多くの哺乳類の小腸陰窩底部に存在するパネート細胞は宿主の免疫に関与する細胞として知られているが、その細胞レベルでの電気生理学的特性やCFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 蛋白の発現について検討された報告はない。そこで、モルモット小腸より単離した陰窩パネート細胞を用いて、dibutyryl cAMPとforskolinのカクテルによる刺激を加えたところ、CFTR Cl<sup>-</sup>電流と多くの共通点を持ったCl<sup>-</sup>電流が活性化されたが、単一細胞RT-PCR法や抗CFTR抗体による免疫染色ではパネート細胞にCFTR蛋白の発現を認めなかった。

一方、容積感受性Cl<sup>-</sup>チャネルは上皮細胞の持つ基本的な生理的機能の1つである細胞容積調節に寄与するが、チャネル分子そのものまたはその調節因子と考えられているpI<sub>Ca</sub>蛋白が細胞外にヌクレオチド結合ドメインを持つことから、その細胞外ヌクレオチドに対する感受性が注目されている。アデニンヌクレオチドはATP>ADP>AMPの順にヒト小腸培養細胞Intestine-407の容積感受性Cl<sup>-</sup>電流を有意に抑制したがcAMPは電流を増加させた。

本研究はCFTR蛋白を発現していないパネート細胞の電気生理学的特性すなわち新しいタイプのcAMP依存性Cl<sup>-</sup>コンダクタンスを有することや、小腸上皮細胞の容積感受性Cl<sup>-</sup>電流の細胞外ヌクレオチドに対する感受性を明らかにしたもので、小腸上皮細胞の機能の解明に寄与するところが大きい。

従って、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年12月11日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。