

ミニ腸を用いた腸管 NaCl 吸収機構の解明

石塚 典子

静岡県立大学食品栄養科学部

概要

体液量の調節には消化管からの NaCl 吸収と腎臓での排泄が重要であるが、消化管の NaCl 吸収の分子機構は十分に明らかにされていない。主要な NaCl 液吸収機構に関しては、小腸では Na⁺依存性栄養素吸収機構と、Na⁺輸送体と Cl⁻輸送体がカップルする機構が存在し、大腸では主に後者のみが働いていると考えられている。大腸では、Na⁺輸送体の分子実体は NHE3、Cl⁻輸送体は DRA (down-regulated in adenoma, slc26a3) であることが明らかにされている。小腸では、Na⁺輸送体は大腸と同様に NHE3 であることが示されているが、Cl⁻輸送体に関しては PAT1 (putative anion transporter 1, slc26a6) が候補と想定されているものの不明な点が多い。また我々は小腸では、NHE3 が、パートナーを替え栄養素輸送体ともカップルすることを示している。しかし、Na⁺輸送体のカップリングパートナーが異なる理由や、そのカップリング様式の分子機構、更にそれらが栄養素とどのように相互作用するかは全く知られていない。そこで本研究では NaCl 吸収輸送体のカップリング機構を明らかにすることを目的とし、Na⁺輸送体と Cl⁻輸送体の腸管各部位の発現と機能を検討した。

マウスより摘出した腸管を小腸三部位、盲腸、大腸三部位に分け、免疫染色により、各部位における NHE3、DRA、Claudin-15 (傍細胞間 Na⁺輸送タンパク質) の発現を検討した。また、ユッシングチャンバー法にて経上皮イオンフラックスの測定を行なった。

NHE3 は小腸では絨毛細胞で発現しており、部位による発現量の差は観察されなかった。また盲腸、近位、中位大腸では、表層細胞で発現が観察され、遠位大腸では発現が減少した。DRA は、盲腸、中位および遠位大腸の表層細胞で強く発現しており、NHE3 の発現局在とほぼ一致した。Claudin-15 は、小腸では NHE3 とほぼ同様の発現パターンを示し、絨毛細胞に発現した。しかし盲腸ならびに近位、中位大腸では陰窩細胞で発現が観察された。Claudin-15 は小腸では Na⁺依存性栄養素吸収機構に関与していることが示されている。盲腸、大腸では陰窩細胞で発現していることから、小腸とは異なる機能に Claudin-15 が関与していることが示唆された。続いて、NHE3 特異的抑制剤 S3226 存在下での ³⁶Cl⁻フラックスを比較することより NHE3 と Cl⁻輸送体の共役機構を検討した。部位は、免疫染色により NHE3 の発現が観察された中位小腸と中位大腸を用いた。基線状態の粘膜側から漿膜側の ³⁶Cl⁻フラックスは、小腸では約 30 μmol/cm²/h、大腸では約 50 μmol/cm²/h と大腸で、より大きな ³⁶Cl⁻フラックスが観察された。S3226 存在下では、小腸と大腸いずれも ³⁶Cl⁻フラックスが抑制され、NHE3 と Cl⁻輸送体が共役することが示唆された。S3226 による ³⁶Cl⁻フラックスの抑制の程度は、小腸と大腸では同程度であり、NHE3 と DRA、NHE3 と Pat1 のカップリングの機序には共通点があることが示唆された。

マウス摘出標本でのフラックス測定では小腸と大腸での上皮の立体構造の違い、組織内での輸送体の発現部位差などにより、Na⁺輸送体、Cl⁻輸送体の共役機構を定量的に直接比較することは困難である。このため、腸管より幹細胞を単離し、分化させ腸管オルガノイドを作成し、さらに単層上皮に分化させることを試み、二次元培養の条件検討を行った。

腸管上皮幹細胞は陰窩細胞に豊富に含まれるため、マウス腸管より陰窩細胞を単離し、マトリゲル中で 3D スフェロイドとして増殖、維持した。3D スフェロイドは 50% L-WRN CM (Wnt3a, R spondin3 and Noggin conditioned medium) に保存した。単層上皮細胞を形成するために、培養 3 日目の 3D スフェロイドを再懸濁し、カバースリップまたはトランスウェルに播

種した。24 時間後、50% L-WRN CM を除去し、0% CM で置き換え、細胞を分化させた。

陰窩細胞の単離には、5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 55 mM sorbitol を含む上皮細胞分散用溶液を用いることで、単離される陰窩細胞の数が増加し、幹細胞スフェロイドの発育が改善した。また、実験毎に、細胞の増殖に大きなばらつきが観察され、これは、L-WRN CM 中のニッチ因子である Wnt の濃度がコントロールされていないことによると考えられたため、継代後 24 時間は幹細胞培養液に Wnt シグナルを活性化する CHIR99021 を添加したところ幹細胞スフェロイドの発育が向上した。既報では幹細胞培養液にはアノキスを防ぐために、ROCK 抑制剤である Y-27632 を添加している。分化誘導時には Y-27632 存在下では多核化する細胞が見られたが除くことで改善された。さらに、分化誘導時には Notch シグナルを間接的に抑制するガンマセクレターゼの抑制剤である DAPT を添加することで分化が促進され、単層円柱上皮様の細胞が形成された。単層オルガノイド形成するためにカバースリップおよびトランスウェルに塗布するコーティング剤は既報では 0.1% ゼラチンが用いられているが、2.5% マトリゲルに変更したところ、連続した単層円柱上皮が再現性よく形成された。

オルガノイドの mRNA 発現を比較したところ、腸管上皮幹細胞マーカーはいずれの部位でも幹細胞スフェロイドでは濃縮され、分化誘導した細胞群では検出されず、腸上皮に分化していることが示唆された。NHE3 と *DRA* は幹細胞スフェロイドでは発現が大きく低下し、分化誘導した細胞群では発現が増加し、ネイティブ組織の絨毛並びに表層細胞様に分化していることが示唆された。*Claudin-15* では小腸では分化後に mRNA 発現が高くなっていたが、盲腸、大腸由来の幹細胞では発現が増加しなかった。免疫染色では、NHE3 はいずれの部位でも微絨毛様構造状に観察された。*DRA* は、盲腸では微絨毛様構造に高発現していた、近位大腸では、核近傍と思われる場所に発現していた。トランスウェル上に分化誘導した単層腸オルガノイドを用いてバリア機能を評価したところ、ネイティブ組織とは異なり、単層腸オルガノイドでは、近位よりも遠位大腸で経上皮コンダクタンスが上昇する傾向が観察された。

今後は、この単層腸オルガノイドを用いて機能測定を行い、 Na^+ 吸収輸送体と Cl^- 吸収輸送体のカップリングについて詳細に検討していく予定である。

1. 研究目的

体液量の調節には消化管からの NaCl 吸収と腎臓での排泄調節が重要であるが、消化管の NaCl 吸収の分子機構は十分に明らかにされていない。消化管においては、食事に含まれる 10 g の NaCl 以外に、多量の消化液(唾液(1L)、胃液(2L)、胆汁(1L)、膵液(2L)、小腸分泌液(1L))が分泌されており、これらに含まれる NaCl が合わさり、小腸には 9L の NaCl 液として負荷される。この多量の NaCl 液は小腸で 80% 以上が吸収され、残りの約 20% である 1.5L が大腸から吸収される。主要な NaCl 液吸収機構に関しては、小腸では Na^+ 依存性栄養素吸収機構と、 Na^+ 輸送体と Cl^- 輸送体がカップルする機構が存在し、大腸では主に後者のみが働いていると考えられている。また、小腸、大腸いずれも Cl^- が存在しないと Na^+ は吸収されない。このことから、 Na^+ 輸送体と Cl^- 輸送体がカップルする NaCl 吸収機構に関しては、小腸と大腸では同じ機構であると考えられていた。NHE3(Na^+/H^+ exchanger isoform 3)ノックアウトマウスの解析により、 Na^+ 輸送体の分子実体は、小

腸、大腸のいずれにおいても NHE3 であることが示された (Fig. 1)。一方、 Cl^- 輸送体に関しては、大腸で発現が高い *DRA* (down-regulated in adenoma, *slc26a3*) をノックアウトすると重篤な下痢が観察され、大腸 Cl^- 輸送の分子実体は *DRA* であることが示された。小腸では、*DRA* と同じ *slc26* ファミリーで小腸での発現が高い *PAT1* (putative anion transporter 1, *slc26a6*) が候補と想定されているが、*PAT1* ノックアウトマウスでは、小腸液吸収障害が大きく変化していない⁽¹⁾。しかし *PAT1* ノックアウトマウスの解析では NHE3 とカップルすることが示されている⁽²⁾ (Fig. 1)。さらに、野生型マウスでは多量のフルクトースを摂取すると小腸 NaCl 吸収亢進による高血圧が惹起されるのに対し、*PAT1* ノックアウトマウスでは起きなかった⁽³⁾。つまり、液吸収の大部分を担う小腸では NaCl 輸送の分子機構は解明できていない。更に、申請者は最近、NHE3 が、 Cl^- 輸送体ではなくペプチド吸収輸送体 (*PepT1*, peptide transporter 1) と強くカップルしていることを見出している⁽⁴⁾ (Fig. 1)。これらのことは、小腸では NHE3 は栄養素吸収

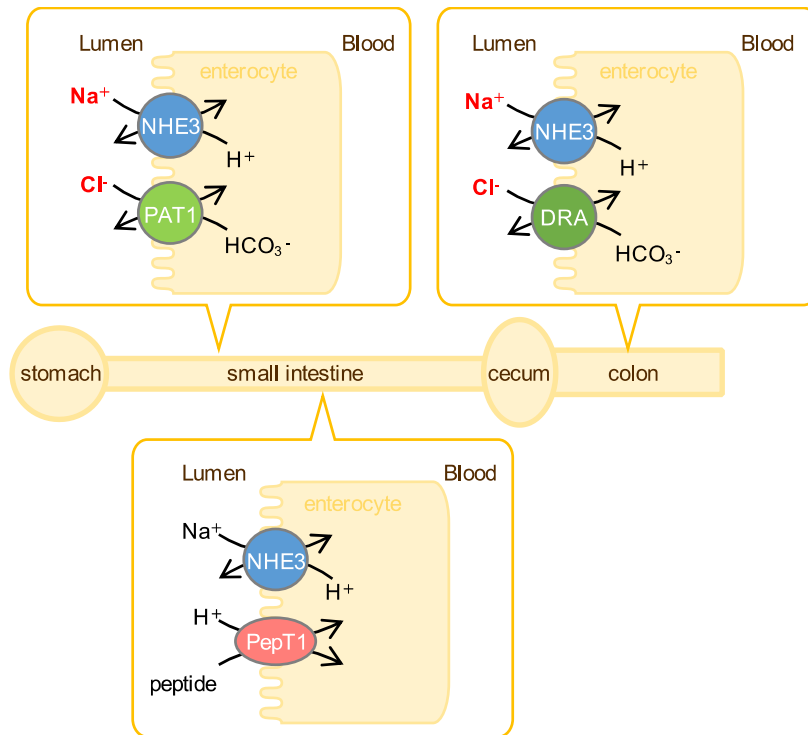


Figure 1. Schematic drawing of the coupling mechanisms between Na^+ and Cl^- transporters.

等の状況により、カップリングパートナー（他のプロトン依存性栄養素吸収機構、葉酸やアミノ酸など）を替えている可能性を示しており、別の手法や視点からの NaCl 吸収機構の再考が必要であることを示唆している。

本研究の目的は、 NaCl 吸収機構における NHE3 のカップリングパートナーである Cl^- 輸送体が小腸と大腸で異なることの生理的意義の解明と、更に、小腸の NaCl 吸収機構と栄養素吸収との相互作用を明らかにすることである。

2. 研究方法

2.1 動物

動物は C57BL/6jcl を用い、実験前は一晩絶食させた。マウス腹腔内に $10 \mu\text{L/g}$ 体重の三種混合麻酔薬（塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファンール）を投与し、麻酔下にて腸管を摘出した。

2.2 免疫染色

マウス腸管は小腸三部位、盲腸、大腸三部位に分け、それぞれ PBS にて洗浄した後、水分を取り除いて OCT コンパウンド（サクラファインテック）に包埋し、 -80°C に急速凍結した。5 μm 厚に薄切した切片をガラスカバースリップに貼り付け、標本とした。乾燥させた標本を氷冷下で 95% エタノールに 30 分間浸漬した後、5% スキムミルク/0.1%

Triton in PBS で室温にて 30 分間プレブロックし、1 次抗体に室温にて 30 分間、2 次抗体に室温にて 30 分間、それぞれインキュベートした。蛍光像は、共焦点顕微鏡（Carl Zeiss LSM700）を用いて取得した。

2.3 ユッシングチャンバー法による、電氣的パラメータ並びに経上皮イオンフラックスの測定

摘出したマウス腸管を長軸に沿って切開し、実体顕微鏡下にて、ピンセットで筋層を剥離し、粘膜と粘膜下層からなる標本を作成した。粘膜標本を直径 4 mm または 5 mm の円形窓が開いた一対のユッシングチャンバーに装着した。大腸では腸壁内神経の影響を抑制するために $0.3 \mu\text{M}$ TTX を漿膜側に添加した。短絡条件下（short-circuit condition）にて、短絡電流および経上皮コンダクタンスを測定した。経上皮のイオン透過性は放射性同位元素（ $^{22}\text{Na}^+$ 、 $^{36}\text{Cl}^-$ ）を用いて測定した。ユッシングチャンバーに標本を装着後、粘膜側または漿膜側の一侧の代用液を放射性同位元素でラベルし、反対側の代用液を 20 分おきに採取し、その変化量から各イオンの経上皮フラックスを算出した。

2.4 腸オルガノイドの作成

既報⁵⁾に従い、腸管上皮幹細胞を分離し、マトリゲル中で 3D スフェロイドとして増殖、維持した（Fig. 2, 24 ウェル

プレート)。3D スフェロイド腸管上皮幹細胞は 50% L-WRN CM (Wnt3a, R spondin3 and Noggin conditioned medium) に保存し、細胞は発育状況に応じ 2 ~ 5 日ごとに継代した。カバースリップまたはトランスウェルに単層上皮細胞を形成するために、播種後 3 日目の 3D スフェロイドを採取した。トランスウェルは予め、0.1%ゼラチンまたは 2.5%マトリゲルを 37°C で 1 時間以上コーティングした。平均して、24 ウェルプレートの 2 つのウェルからのスフェロイドを単一のウェル(約 0.32 cm²)にプレーティングした。細胞処理(カバースリップまたはトランスウェルへの播種)から 24 時間後、50% L-WRN CM を除去し、0% CM で置き換え、細胞を分化させた。トランスウェル上に播種した単層オルガノイドは外科用ブレードを用いてインサートから膜を切り出し、マウス摘出標本と同様に測定に用いた。

2. 5 Real time RT PCR 法

標本は、培養前の単離した陰窩細胞、未分化の 3D スフェロイド、分化させた 3D スフェロイド(分化用培養液に置換後 3 日目)を用いた。総 RNA 抽出は Nucleospin RNA (MACHEREY -NAGEL ドイツ)を用い、マニュアルに準じて行った。cDNA の合成は Prime Script RT Master mix (TAKARA)を用い、マニュアルに準じて行った。リアルタイム PCR は Thermal Cycler Dice Real Time System II (TAKARA)を用いて行った。ハウスキーピング遺伝子とし

て β -actin, GAPDH を用い、 $\Delta \Delta Ct$ にて解析を行った。PCR の条件は Filter FAM, 95°C, 5 分を 1 サイクル、95°C, 10 秒, 60°C, 20 秒, 72°C, 30 秒を 40 サイクル、Dissociation を行った。

3. 研究結果

3. 1 腸管各部位の NaCl 関連輸送体の発現

マウスより小腸 3 部位、盲腸および大腸 3 部位を採取し、NHE3 (Na⁺輸送体)、DRA (Cl⁻輸送体)、Claudin-15 (傍細胞間 Na⁺輸送タンパク質)の蛍光免疫染色を行なった (Fig. 3)。NHE3 は小腸では絨毛細胞で発現しており、部位による発現量の差は観察されなかった。また盲腸、近位、中位大腸では、表層細胞で発現が観察され、大腸遠位部では発現が減少していた。DRA は、盲腸、中位および遠位大腸の表層細胞で強く発現しており、NHE3 の発現局在とほぼ一致していた。Claudin-15 は、小腸では NHE3 とほぼ同様の発現パターンを示し、絨毛細胞に発現していた。しかし盲腸ならびに大腸(近位、中位部)では陰窩細胞で発現が観察された。Claudin-15 は小腸では Na⁺依存性栄養素吸収機構に関与していることが示されている⁽⁶⁾。盲腸、大腸では陰窩細胞で発現していることから、小腸とは異なる機能に Claudin-15 が関与していることが示唆された。

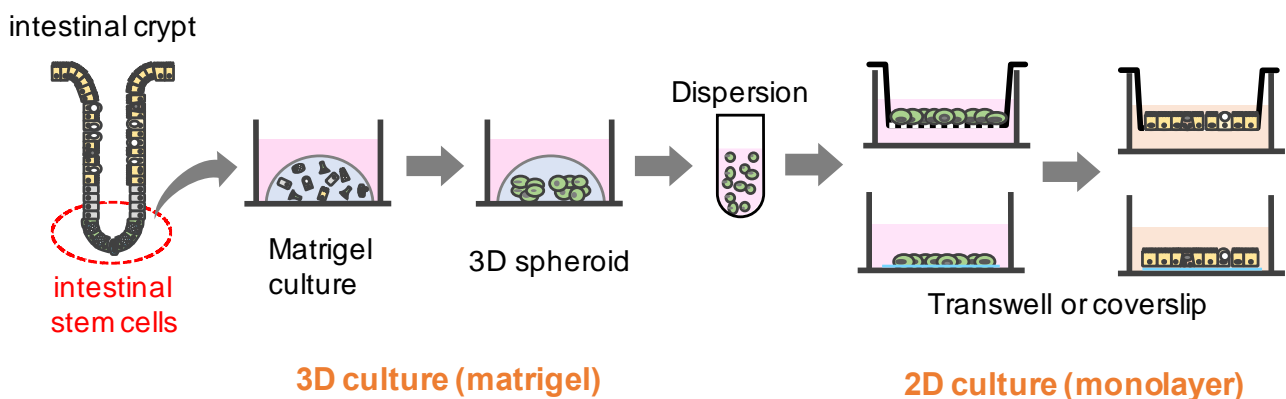


Figure 2. Schematic drawing of experimental procedure.

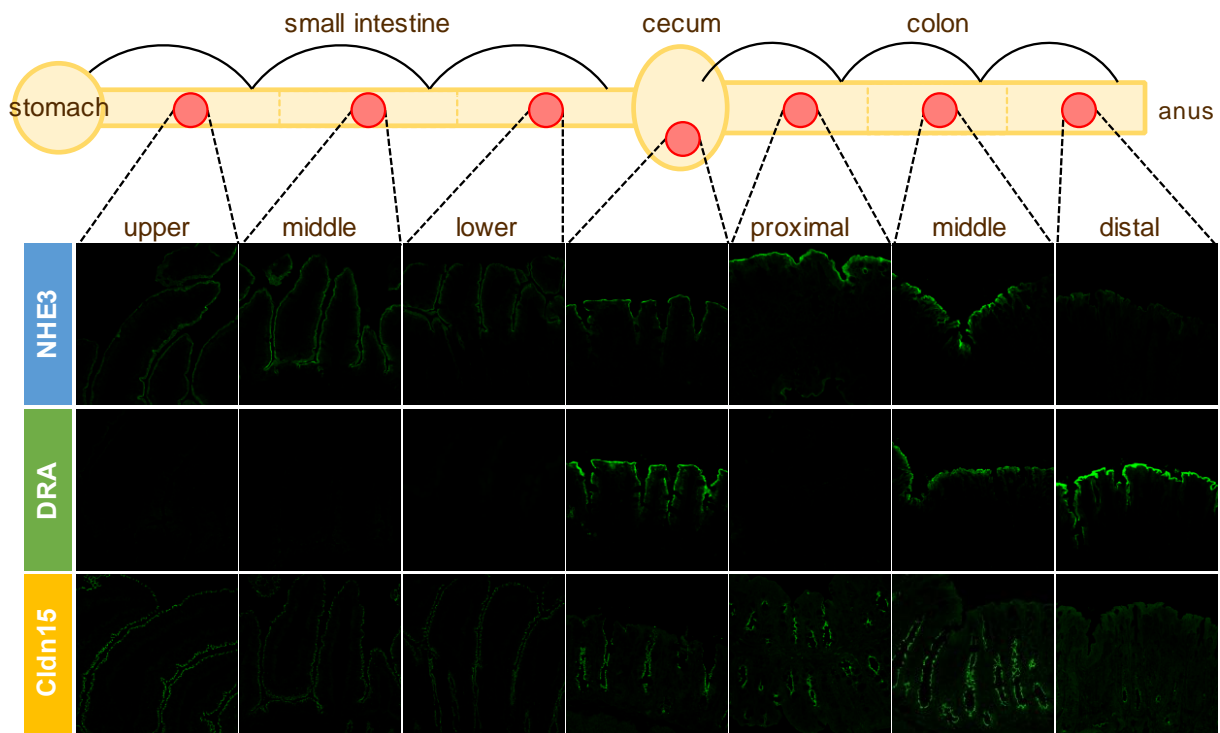


Figure 3. Segmental difference of NaCl-related transporters in the mouse intestine.

3. 2 経上皮 Cl⁻フラックス測定による NHE3 との機能的共役の検討

消化管における NaCl 吸収は Na⁺輸送体(NHE3)と Cl⁻輸送体(小腸では Pat1,大腸では DRA)が共役することにより行われていると考えられている (Fig. 1)。S3226 は NHE3 を特異的に抑制すると報告されているため, S3226 存在下での ³⁶Cl⁻フラックスを比較することより Cl⁻輸送体の共役機構を検討した (Fig. 4)。部位は, 免疫染色により NHE3 の発現が観察された中位小腸と中位大腸を用いた。まず基線状態の粘膜側 (Mucosal side) から漿膜側 (Serosal side) の ³⁶Cl⁻フラックスを測定した。小腸では約 30 μmol/cm²/h であり, 大腸では約 50 μmol/cm²/h と大腸で, より大きな ³⁶Cl⁻フラックスが観察された。S3226 存在下では, 小腸と大腸いずれも ³⁶Cl⁻フラックスが抑制され, NHE3 と Cl⁻輸送体が共役することが示唆された。S3226 による ³⁶Cl⁻フラックスの抑制の程度は, 小腸と大腸では同程度であり, NHE3 と DRA, NHE3 と Pat1 のカップリングの機序には共通点があることが示唆された。

3. 3 腸管オルガノイド

上述の, マウス摘出標本でのフラックス測定では小腸と大腸での上皮の立体構造の違い, 組織内での輸送体の

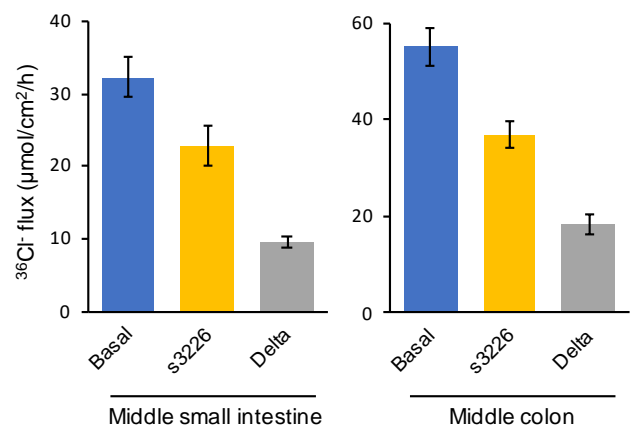


Figure 4. The effect of s3226 on transepithelial Cl⁻ fluxes.

発現部位差などにより, Na⁺輸送体, Cl⁻輸送体の相互作用の解釈は大きく異なる。すなわち, 小腸と大腸の Na⁺輸送体, Cl⁻輸送体の共役機構を定量的に直接比較することは困難である。このため, 腸管より幹細胞を単離し, 分化させ腸管オルガノイドを作成し, さらに単層上皮に分化させることを試み, 二次元培養の条件検討を行った。

3. 3-1 腸陰窩細胞の単離方法の検討

摘出したマウス腸管を長軸に沿って切開し、小腸絨毛または大腸表層部をスライドグラスで削り取ることで物理的に除去した。その後、5 mm 程度に切断し 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 55 mM sorbitol を含む上皮細胞分散用溶液⁷⁾で 4°C, 30 分間インキュベートした。容器を振盪し剥離した幹細胞を含む陰窩細胞群を 70 μm のストレーナーに通し、マトリゲル 3D 培養に用いた。これら操作により単離される陰窩細胞の数が増加し、幹細胞スフェロイドの発育が改善した。

3. 3-2 幹細胞培養液添加物の検討

幹細胞を継代またはカバースリップ、トランスウェルへ播種した際に、実験毎に、その後の細胞の増殖に大きなばらつきが観察された。これは、幹細胞培養に用いている、L-WRN CM 中のニッチ因子である Wnt の濃度がコントロールされていないことによると考えられた。このため、継代後 24 時間は幹細胞培養液に Wnt シグナルを活性化する CHIR99021 を添加することで幹細胞スフェロイドの発育が向上した (Fig. 5A)。

既報では幹細胞培養液にはアノイキス(マトリクス間の接着喪失により誘導されるアポトーシス)を防ぐために、ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase) 抑制剤である Y-27632 を添加している。さらに、分化誘導時には Notch シグナルを間接的に抑制するガンマセクレターゼの抑制剤である DAPT (N-[N-(3, 5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester) を添加し、培養条件を検討した。Y-27632 存在下では細胞が多核化すること (Fig. 5B) が見られたが除くことで改善された。さらに、DAPT を添加することで分化が促進され、単層円柱上皮様の細胞が形成された (Fig. 5B, D)。

3. 3-3 単層オルガノイド形成におけるコーティング剤の検討

幹細胞をカバースリップ、トランスウェルへ播種した際のコーティング条件を検討した。カバースリップおよびトランスウェルに塗布するコーティング剤は既報では、0.1%ゼラチンが用いられているが、本研究では最初に 0.1%ゼラチンを試みたが上皮細胞はしばしば島状になった (Fig. 5C)。上皮機能をネイティブ組織と同様にユッシングチャンバー法で測定するためには、連続した単層上皮を再現性よくトランスウェル上に培養する必要がある。0.1%ゼラチンから

2.5%マトリゲルに変更したところ、連続した単層円柱上皮が再現性よく形成された (Fig. 5C, D)。

3. 3-4 腸オルガノイドの遺伝子発現の検討

上記手法で、確立された腸オルガノイドを用いて、最初に分化の進行度を mRNA 発現の変化により検討した。未分化細胞の指標として腸管上皮幹細胞マーカーである Lgr5 (leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5)、成熟細胞の指標として輸送体である NHE3 および DRA、タイトジャンクション形成の指標として Claudin-15 の遺伝子発現を測定した (Fig. 6A)。Lgr5 はいずれの部位でも幹細胞スフェロイドでは濃縮され、分化誘導した細胞群では検出されず、腸上皮に分化していることが示唆された。NHE3 と DRA は幹細胞スフェロイドでは発現が大きく低下し、分化誘導した細胞群では発現が増加し、ネイティブ組織 (Fig. 3) の絨毛並びに表層細胞様に分化していることが示唆された。Claudin-15 では小腸では分化後に mRNA 発現が高くなっていたが、盲腸、大腸由来の幹細胞では発現が増加しなかった。以上より小腸、大腸特異的遺伝子発現パターンは、腸オルガノイドで保持されていることが示唆された。

3. 3-5 腸オルガノイドの輸送体発現の検討

二次元培養した単層腸オルガノイドについて NHE3、DRA の免疫蛍光染色を行った (Fig. 6B)。NHE3 は小腸、盲腸、近位大腸いずれも、微絨毛様構造状に発現していた。DRA は、盲腸では微絨毛様構造に高発現していた、近位大腸では、核近傍と思われる場所に発現していた。

3. 3-6 腸オルガノイドの経上皮コンダクタンスの測定

トランスウェル上に分化誘導した単層腸オルガノイドを用いてバリア機能の評価した。評価は経上皮電気コンダクタンスを測定した。大腸のネイティブ組織では、経上皮コンダクタンスは遠位部では低下する傾向にあることが知られている(青いバー)。しかし、単層腸オルガノイドでは、逆に遠位部では経上皮コンダクタンスが上昇する傾向が観察された (Fig. 6C)。

4. 考察

腸管 NaCl 吸収における Na⁺/H⁺ 交換輸送体と Cl⁻/HCO₃⁻ 交換輸送体の相互の共役について知見を得るため、一方の交換輸送体を阻害した時の他方の交換輸送体の活性に及ぼす効果を検討した。NHE3 の特異的阻害剤である

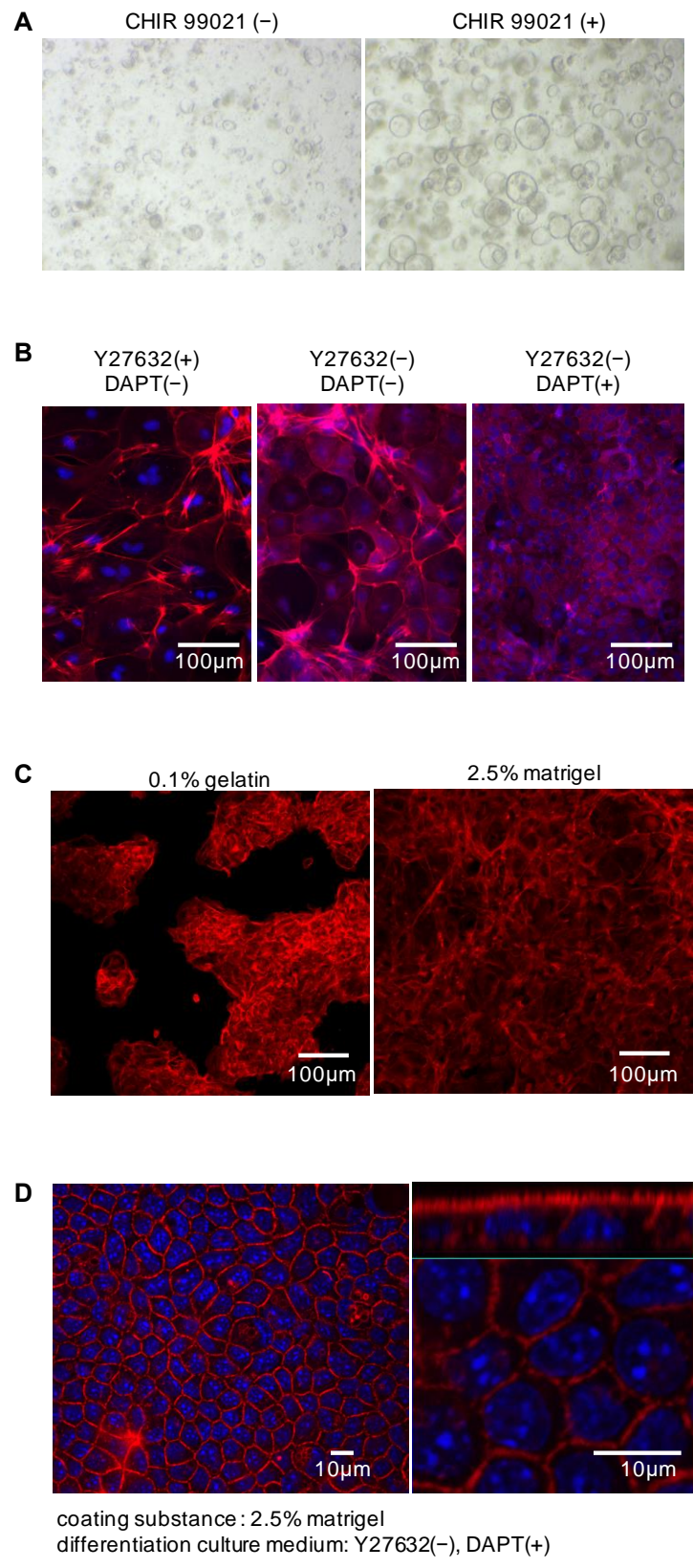


Figure 5. Establishment of experimental procedure of mouse intestinal organoid.

A. The effect of CHIR99021 on proliferation and differentiation of stem cell spheroid., B. The effect of Y27632 and DAPT on proliferation of intestinal organoid., C. The effect of surface coating substance on cell proliferation., D. 3D confocal image of intestinal organoid.

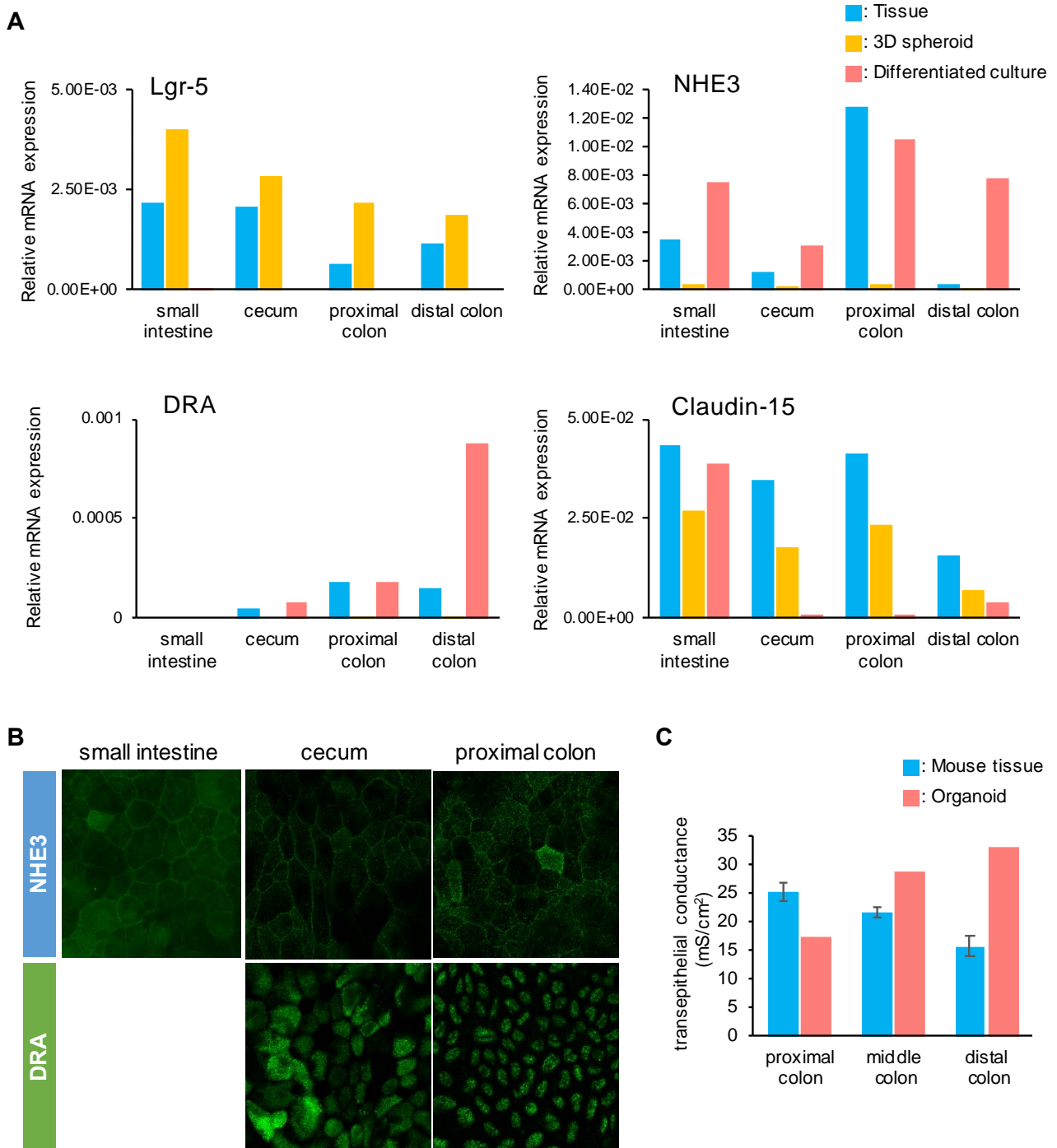


Figure 6

A. Expression level of mRNA in the native tissues and intestinal organoid.

B. Immunofluorescence images of NHE3 and DRA expression in intestinal organoid.

The comparison of transepithelial electrical conductance between native tissue and intestinal organoid.

s3226 を投与することにより、大腸中位部では、 Na^+ 吸収活性および Cl^- 吸収活性の両方が阻害されたことから、 Na^+ 吸収と Cl^- 吸収は密接に共役していることが示唆された。ま

た、その機能を詳細に検討するために、小腸、大腸の単層腸オルガノイドを確立した。小腸では、絨毛上皮細胞様、

大腸では、表層上皮細胞様の単層腸オルガノイドに分化していることが示唆された。

5. 今後の課題

NHE3とDRAの両方の発現の多い大腸中位部において、Na⁺吸収とCl⁻吸収が共役して働いていることが示唆されたが、一方のみが高発現している近位部や遠位部でのそれぞれの輸送体についての役割については不明なままである。今後はそれらの部位でのNaCl吸収に対する寄与についても検討していく必要がある。

また本研究で確立された、単層腸オルガノイドを用い、機能測定を行い、Na⁺吸収輸送体とCl⁻吸収輸送体のカップリングについて詳細に検討していく。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいた公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に御礼申し上げます。

7. 文献

1. Wang, Z.; Wang, T.; Petrovic, S.; Tuo, B.; Riederer, B.; Barone, S.; Lorenz, J.N.; Seidler, U.; Aronson, P.S.; Soleimani, M. Renal and intestinal transport defects in Slc26a6-null mice. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2005, 288, 957–965.
2. Seidler, U.; Rottinghaus, I.; Hillesheim, J.; Chen, M.; Riederer, B.; Krabbenhöft, A.; Engelhardt, R.; Wiemann, M.; Wang, Z.; Barone, S.; et al. Sodium and chloride absorptive defects in the small intestine in Slc26a6 null mice. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2008, 455, 757–766.
3. Singh, A.K.; Amlal, H.; Haas, P.J.; Dringenberg, U.; Fussell, S.; Barone, S.L.; Engelhardt, R.; Zuo, J.; Seidler, U.; Soleimani, M. Fructose-induced hypertension: Essential role of chloride and fructose absorbing transporters PAT1 and Glut5. *Kidney Int.* 2008, 74, 438–447.
4. Ishizuka, N.; Nakayama, M.; Watanabe, M.; Tajima, H.; Yamauchi, Y.; Ikari, A.; Hayashi, H. Luminal Na⁺ homeostasis has an important role in intestinal peptide absorption in vivo. *Am. J. Physiol.* 2018, 315, G799–G809.
5. Miyoshi, H.; Stappenbeck, T.S. In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells as organoids. 2013, 8, 2471–82.
6. Nakayama, M.; Ishizuka, N.; Hempstock, W.; Ikari, A.; Hayashi, H. Na⁺-coupled nutrient cotransport induced luminal negative potential and claudin-15 play an important role in paracellular Na⁺ recycling in mouse small intestine. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, E376.
7. Wang, F.; Wang, J.; Liu, D.; Su, Y. Normalizing genes for real-time polymerase chain reaction in epithelial and nonepithelial cells of mouse small intestine. *Anal. Biochem.* 2010, 399, 211–217.2)

Elucidation of the Intestinal NaCl Absorption Mechanism Using Mini-Guts

Noriko Ishizuka

University of Shizuoka School of food and nutritional sciences

Summary

Intestinal NaCl absorption is thought to be mediated by functional coupling of a Na⁺ transporter and a Cl⁻ transporter. Although the Na⁺ transporter has been shown to be Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3) throughout the intestine, the Cl⁻ transporter is different in each intestinal segment. Namely, slc26a6 plays a major role in Cl⁻ absorption in the small intestine, and another Cl⁻ transporter, slc26a3, plays a major role in Cl⁻ absorption in the large intestine. We have also shown that NHE3 changes coupling partner to H⁺-coupled peptide transporter (pepT1) when H⁺-coupled peptide absorption is activated. However, the molecular mechanism of each coupling mode remains to be determined. To investigate this, we first determined the involvement of Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in NaCl absorption in each intestinal segment of mice. Chambers were used to measure transepithelial ²²Na⁺ and ³⁶Cl⁻ fluxes across the intestinal membrane. The addition of NHE3 specific inhibitor S3226 to the luminal side induced simultaneous inhibition of ²²Na⁺ and ³⁶Cl⁻ fluxes in the middle small intestine and middle colon. In addition, the magnitude of functional coupling between NHE3 and Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger was approximately equal in the middle small intestine and middle colon. These results suggest that the mode of coupling of NHE3 and each Cl⁻ transporter is similar along intestinal segments. However, morphological differences between the small intestine and large intestine complicates the interpretation of these results. To overcome this problem, we tried to establish mini-gut monolayers from intestinal stem cells. We assessed the expression of NHE3 and slc26a3 in mini-guts by immunohistochemistry and qPCR. The expression of slc26a3 was not detected in the small intestine mini-guts, but was expressed in the large intestine mini-guts. However, NHE3 was expressed in both type of mini-guts. These results suggest that mini-guts derived from different intestinal segments reflect the segment-specific expression of ion transporters in the intestine.