

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：43807

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11648

研究課題名（和文）腹膜タイト結合におけるクローディン15の生理学的意義の検討

研究課題名（英文）Altered by claudin-15 deficiency in peritoneal mesothelium

研究代表者

竹下 典子（Takeshita, Noriko）

静岡県立大学短期大学部・短期大学部・准教授

研究者番号：30440283

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：腹膜は腹腔内を包む膜で、透析療法に用いられており、腹膜を介した物質の透過性は高いと考えられている。本研究では、腹膜のタイト結合に発現するクローディン15が腹膜物質透過性に与える影響を明らかにすることを目的とした。しかし、クローディン15欠損マウスを用いた実験では、腹膜のイオン透過性における明確な変化は見られず、グルコース腹腔内投与による血糖上昇にも差は認められなかった。これにより、クローディン15が腹膜の物質透過性には寄与していない可能性が示唆された。今後は、高分子の透過性やタイト結合の生理的重要性をさらに明らかにするための研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹膜は腹腔内を包む膜で、その表面は中皮細胞からなる単層で、深部は結合組織でできている。腎不全に対する腹膜透析療法では、この腹膜が透析膜の役割を果たし、腹腔内に投与された透析液中には、中皮細胞を介し、体内の老廃物が抽出される。腹膜透析を、合併症を起こさずより長期に行うためには透析液の組成が重要であると考えられている。現在も腹膜にできるだけ優しい腹膜透析液が開発されているが、透析液の組成には未だ再考の余地があり、そのためには腹膜の輸送特性を知る必要がある。腹膜のイオン透過性を解明することは、将来的にはより効率的で安全な腹膜透析法の開発につながる非常に重要な事項である。

研究成果の概要（英文）：The peritoneum, a membrane enveloping the abdominal cavity, consists of a surface layer of mesothelial cells and deeper connective tissue. The mesothelium controls substance diffusion, known for its high permeability. This study aimed to assess claudin 15's impact on peritoneal substance permeability.

Using claudin 15-deficient mice, we observed no significant change in ion permeability regardless of claudin 15 presence. Glucose administered intraperitoneally induced similar blood glucose increases in both wild-type and deficient mice. Scanning electron microscopy showed no alterations in glandular structures of the peritoneal mesothelium due to claudin 15 deficiency. Despite widespread expression, claudin 15 did not regulate ion or small molecule permeability, suggesting its limited role in these processes. Future research should explore macromolecular permeability and peritoneal tight junctions' physiological significance.

研究分野：栄養学および健康科学関連

キーワード：腹膜 クローディン15

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腹膜は、表層にある1層の中皮細胞と、深部にある結合組織である間質から構成されており、間質には毛細血管がある。腹膜透析においては、中皮細胞は透析液と接しており、間質の血管より、老廃物、水、Na⁺などの移動が起こる。この中皮細胞のタイト結合部の存在は30年以上前に知られていたが、その生理学的意義については明らかにされていない。

我々は、腸管のタイト結合の研究において、偶然、腹膜のタイト結合にクローディン15が発現していることを見つけた。クローディンは、現在までに27種類が知られ、その発現パターンは臓器や組織で異なり、多様な組み合わせがある。クローディンの機能特性は大きく2種類に分けられ、タイト結合を密に結合させるバリア型のクローディンと、選択的なイオン透過性(陽イオン選択性または陰イオン選択性)を有しているチャンネル型クローディンが存在することが知られている。このことは、クローディンは単に細胞間を密に結合しているのみではなく、臓器ごとに異なる生理機能を、タイト結合を介して各臓器に持たせる可能性を示唆している。小腸に主に発現しているクローディン15は、腸上皮におけるタイト結合のNa⁺選択的透過性に重要な役割をしていること、さらに、このNa⁺選択的透過性はNa⁺依存性栄養素吸収に重要であることを我々の研究室では明らかにした(*Gastroenterology*, 2011、*Am J Physiol*, 2018、*Int J Mol Sci*, 2020)。これら成果は、クローディン15により形成される選択的透過路がNa⁺を通すことにより、小腸上皮膜に効率的なNa⁺依存性栄養素吸収機能を付与していることを示した。しかし、これまでにクローディン15が腹膜に発現していることは知られておらず、腹膜におけるタイト結合の構成分子やその役割についても検討されていない。

2. 研究の目的

クローディン15が腹膜中皮細胞でどのような生理機能を有しているかを検討するため、クローディン15欠損マウスを用い、腹膜タイト結合の生理学的意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)野生型マウスの腹膜におけるクローディン-15の発現

野生型マウスの腹膜においてNa⁺依存性グルコーストランスポーターSGLT1, 2とクローディン2,3,10aの遺伝子発現量をリアルタイムRT-PCR法にて測定した。

また、腹膜は、消化管などの臓器を直接包んでいる臓側腹膜、消化管を離れて二重膜で腸を吊り下げている腸間膜、体壁に移行して腹腔を覆っている壁側腹膜の3つに分類される。そこで、臓側腹膜として、小腸と腎漿膜、壁側腹膜として横隔膜と腹壁、および腸間膜を採取し、蛍光免疫染色によってクローディン-15の局在を観察した。

(2)傍細胞経路のイオン透過性評価

中皮細胞間隙のイオン透過性を評価するためUssingチャンバー法を用い希釈電位を測定することにより電気生理学的に評価した。野生型マウス及びクローディン15欠損マウスから横隔膜を摘出し、胸膜側を剥離して腹膜中皮膜の1層からなる標本を作成した。希釈電位は、チャンバー内のNaCl濃度を両側が同じNa濃度から、一側を半分に希釈したときの経上皮電位差の変化から求め、Goldman-Hodgkin-Katzの式からNa⁺およびCl⁻に対する透過性比(P_{Na}/P_{Cl})を算出した。

(3)腹膜の物質透過性評価

腹膜の物質透過性を評価するために、野生型マウスとクローディン-15欠損マウスで腹腔内にグルコースを投与し、血糖値上昇より評価した。8時間絶食したマウスの空腹時血糖を測定後、5%グルコース水溶液1mlを腹腔内に投与した。1時間後と8時間後に血糖値を測定した。

(4)走査型電子顕微鏡による腹膜の観察

腎尿細管や胆嚢上皮では、バリア機能に加えて、自由表面の力学的センサーとしての上皮機能の役割が提唱されており、この機能には腺毛様構造が重要であることが示唆されている。そこで、腹膜中皮にも腺毛様構造が存在することから、クローディン15欠損によってこの構造に変化が生じるかどうかを走査型電子顕微鏡(SEM)で評価した。

4. 研究成果

(1)野生型マウスの腹膜におけるクローディン-15の発現

クローディン-15は腹膜で小腸に匹敵するレベルで高発現していた。さらに、クローディン-2および-3の発現が観察された。SGLT1はわずかに発現していたが、SGLT2の発現は認められな

かった(Fig.1)。

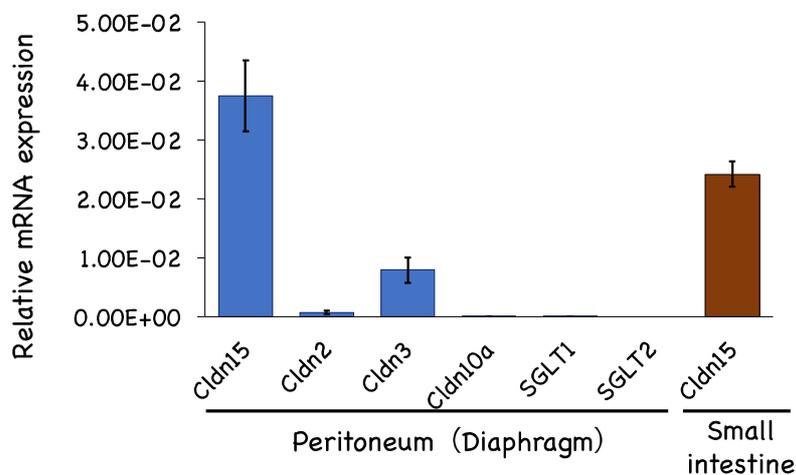


Fig.1 Gene expression of claudin and SGLT in the peritoneum

クローディン-15 は臓側腹膜 (小腸と腎漿膜)、腸間膜、壁側腹膜 (横隔膜と腹壁) のすべての腹膜のタイトジャンクションに強く発現していることが観察された(Fig.2)。

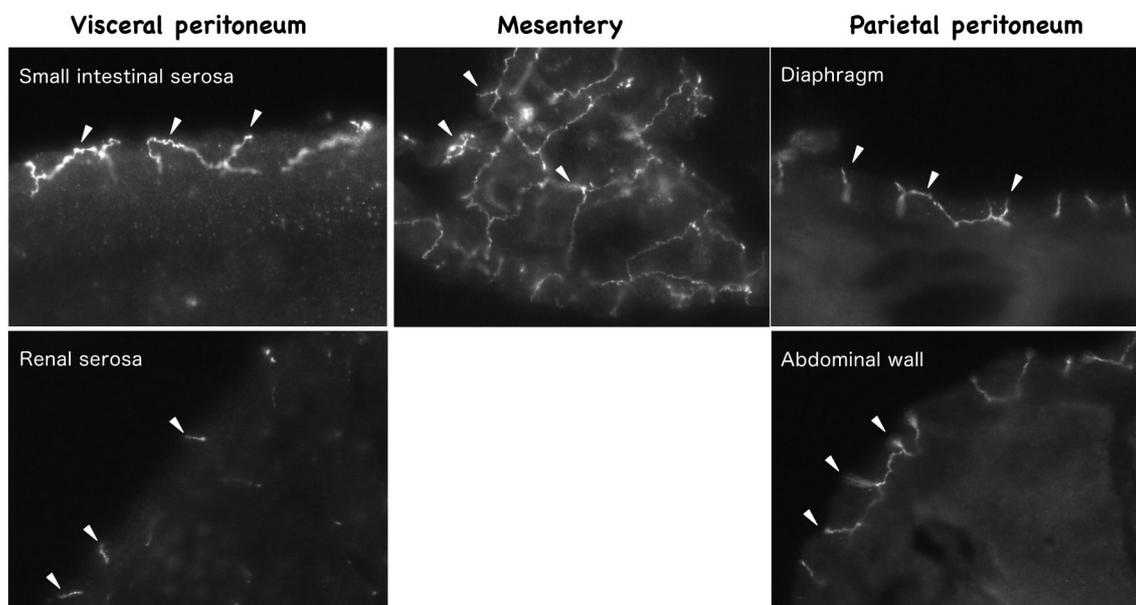


Fig.2 Immunofluorescence images of claudin-15 in each peritoneum

(2) 傍細胞経路のイオン透過性評価

野生型マウスの腹膜にはクローディン-15 が強く発現しているにもかかわらず、 P_{Na}/P_{Cl} は低く、陽イオン選択性はなかった。クローディン-15 欠損マウス (Cldn15 KO) では、野生型と比較して大きな変化は観察されなかった。(Fig.3)

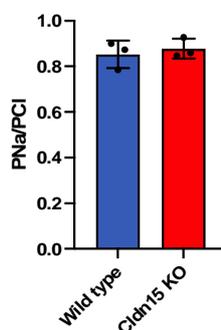


Fig.3. Relative permeability of Na^+ and Cl^- in each peritoneum

(3) 腹膜の物質透過性評価

野生型マウスではグルコース投与後 1 時間で顕著な血糖上昇が見られた。またクローディン-15 欠損マウスのいずれにおいても、ほぼ同等な血糖値上昇が観察され(Fig.4)、腹腔からのグルコースの取り込みは大きく変化していないことが示唆された。このことからクローディン 15 は腹膜の物質透過性に影響を与えないことが示唆された。

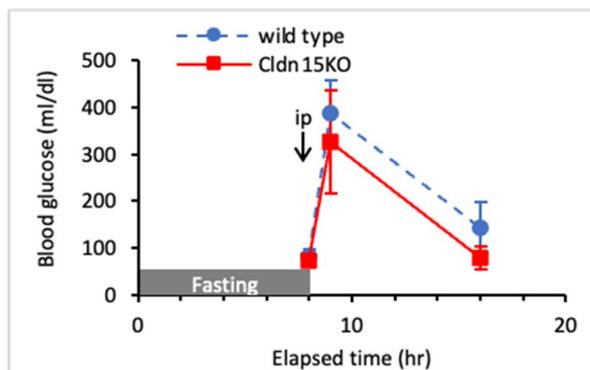


Fig.4 Changes in blood glucose levels after intraperitoneal administration of glucose

(4) 走査型電子顕微鏡による腹膜の観察

野生型マウスとクローディン-15 欠損マウスの腹膜表面には腺毛様の構造が観察された。当初 1 対のみで行った予備的検討ではクローディン-15 欠損マウスでは野生型マウスに比べて腺毛が長くなっている傾向が観察されたが、例数を増やして検討したところ、撮影する部位によって腺毛の長さにはムラがあり、両群に差は見られなかった (Fig.5)。

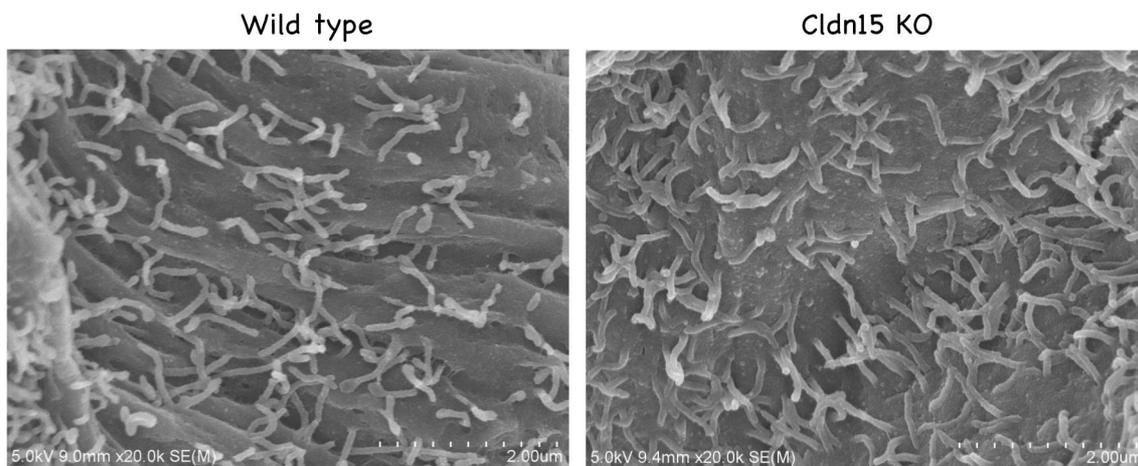


Fig.5 SEM images of peritoneal surface

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石塚典子
2. 発表標題 腹膜タイト結合部におけるクロードイン15の役割
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下典子
2. 発表標題 腹膜中皮におけるクロードイン15欠損の影響
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------