

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19717

研究課題名（和文）小腸Na依存性グルコース吸収機構による他臓器へのシグナル伝達機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of signaling mechanism to other organs by small intestinal Na-dependent glucose absorption mechanism

研究代表者

林 久由（Hayashi, Hisayoshi）

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：40238118

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生活習慣病の原因は、長年の偏った食生活と人間の遺伝子のミスマッチによるものであると推測されている。また、糖やNaClの摂取量が多いことも生活習慣病の原因と考えられている。しかし、腸が食事に合わせて栄養素吸収に必要な多量のNaをどのように供給しているかは明らかになっていない。本研究では、食性が草食から肉食に変わるオタマジャクシとカエル、そして腸内ナトリウム代謝が変化した遺伝子改変マウスとラットを用いて検討を行った。その結果、いずれの種でも、小腸上皮細胞間に存在するバリアタンパク質であるクローディン15が、腸内ナトリウム代謝に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮は、生体を外部環境から保護し、臓器に特有の機能を与える。上皮を通過する物質の移動には、上皮細胞を通るものと細胞間を通るものがある。腸では、単層の上皮が内腔と分離し、病原物質の流入を防ぎつつ、栄養や水分の吸収に必要な選択的透過性を保つ。このバランスが崩れると、クローン病、潰瘍性大腸炎、糖尿病などが発生する可能性がある。本研究では、腸管上皮細胞間のNa透過性にクローディン15が関与しており、健康と疾患の理解に繋がることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The causes of lifestyle-related diseases are hypothesized to be due to long-term unbalanced diets and mismatches in human genes. Additionally, high intake of sugar and NaCl is also considered a cause of these diseases. However, it remains unclear how the intestine supplies the large amounts of Na necessary for nutrient absorption according to dietary intake. In this study, we examined tadpoles and frogs, which undergo a dietary shift from herbivory to carnivory, as well as genetically modified mice and rats with altered intestinal Na metabolism. The results revealed that, in all species, the barrier protein claudin-15, expressed in the intercellular spaces of the small intestinal epithelial cells, plays a crucial role in intestinal Na metabolism.

研究分野：生理学

キーワード：生活習慣病 腸管バリア タイト結合

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームに代表される生活習慣病の原因は、長年の偏った食生活と、ヒト遺伝子のミスマッチに依ることが大きいと推測されている。何を食べ、どのように消化・吸収されるかが生活習慣病に与える影響は大きい。特に糖、NaCl 摂取量は、生活習慣病の主要な原因である。動物の食行動すなわち「食べたい」という「生存にとって必須の、脳からの情報」に依存しており、動物はそれぞれの食環境に応じて脳、それに対応する腸を進化適応させてきた。脳での食欲の研究は多くされてきている。しかし、日常においては、「胃腸の具合が悪く食欲がない」ということは、よく経験することである。しかし、栄養素を受け入れる側の腸が、どのように食行動または他臓器に影響するかは、よく知られていなかった。最近、「腸からグルコースが Na-依存性吸収輸送体で吸収されること」ということが「グルコースの嗜好性」を起こすことに、重要であると示された。興味深いことに、このグルコースの嗜好性は、人工甘味料では惹起されず、舌での味覚は必要ではない。さらに、直接腸管内に、グルコースや代謝されないグルコース投与では「糖の嗜好性」惹起されるが、フルクトースでは惹起されないことが示されている。これは SGLT1 による腸管でのグルコース吸収機構自体が、何からのシグナルを、脳または他臓器にも送っていることを示唆している。

2. 研究の目的

グルコース吸収に必要な Na が小腸内にどのような機序を介して供給されているかについては、またそれが食性とどのように関係しているのかは十分に明らかにされていない。また Na 吸収による脱分極などの情報が、なんらかのシグナルになっている可能性も示唆されている。哺乳類の SGLT1 の Na⁺との化学量論比はグルコース :Na⁺ = 1 : 2 である。ヒトの場合、糖摂取量は 1200kcal/日 (糖質 4kcal/g) であり、これは 300g のグルコース、すなわち 1.7 モルの糖を毎日摂取していることになる。このため管腔内の必要な NaCl は化学量論比から 2 倍の 3.4 モル、約 200g/日と膨大な量様となる。我々は、この多量な Na⁺は、上皮細胞間のタイト結合を構成するタンパク質クローディン 15 によりリサイクルしていることをマウスで明らかにしてきた。本研究では、Na⁺依存性グルコース吸収機構が働いていない動物、また、自然界ではほとんど働いていないと考えられる草食動物の Na⁺依存性グルコース吸収機構の機構を明らかにし、腸からのシグナルにより生体に何が起こるかを観察することを目的とする。このために 3 種のモデル動物を用いて検討を行った。1) クローディン 15 欠損マウスは、腸管内の Na⁺濃度が低く、グルコース吸収不全を起こしている。また、小腸が巨大化しているが、他の臓器等の変化は見られない。本研究では、クローディン 15 欠損マウスに高塩食を摂取させ、腸管 Na 吸収機構を亢進させ、他臓器への変化を観察した。また、2) 食性変化に伴う消化管の栄養素吸収機構の機能的解析をオタマジャクシとカエルを用いておこなった。さらに、3) クローディン 15 遺伝子欠損ラットを作成し、その表現型を解析した。

3. 研究の方法

3-1 クローディン 15 欠損マウスにおける高塩食の影響

3-1-1. クローディン 15 欠損マウスでの解析

クローディン 15 欠損マウスより、妊娠マウスを作出し、その後仔マウスは、雌雄を区別せず実験に用いた (4~6 週齢)。遺伝子型は尾から抽出した DNA を用いて PCR 法で行なった。呼吸ガス分析の代謝ケージ実験は 17~36 週齢のマウスを用いた。

3-1-2. 高 Na⁺食

MS 粉末飼料 (オリエンタル酵母) をコントロール食とし、NaCl を添加することにより高 Na⁺食 (1%、2%NaCl) を作成した。

3-1-3. 代謝実験プロトコール

出生 5 日からコントロール食または 1、2%NaCl 食を与えた。出生 4 週目に親マウスから離乳させ、更に 2 週間各餌で飼育し、6 週齢目に実験に用いた。

3-1-4. 腸管内容物の採取とイオン濃度の測定

マウスに麻酔をかけ、腹部正中で切開し、胃噴門から大腸まで摘出した。小腸は 3 等分、大腸は 2 等分し、その後、胃、小腸 (3 部位)、盲腸、大腸 (2 部位) の計 7 部位の内容物を胃から順次採取した。K⁺、Na⁺濃度は、イオンメーターにより測定した。

3-1-5. 組織染色

3 等分した各小腸部位を OCT コンパウンドに包埋し、クライオスタットで薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い絨毛の高さを測定した。

3-1-6. 代謝ケージ・呼吸ガス分析

Arco-2000 (Arco System) にてコントロール群およびクローディン 15 欠損マウスを呼吸ガス測定用代謝ケージにて個別飼育し、呼吸ガス測定を行った。

3-2-1 オタマジャクシとカエルにおける食性変化に伴う消化管の栄養素吸収機構の機能的解析

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の幼生 (オタマジャクシ Nieuwkoop & Faber (NF))

stage56~59, $2.03 \pm 0.1g$ $n=20$) 並びに成体のカエル ($2.05 \pm 0.2g$ $n=11$) を使用した。また、オタマジャクシは、機能実験において、十分な腸の太さが必要なため、メチマゾールで変態を抑えて飼育し、約 $2.0g$ に成長した個体を用いた。実験に使用するまで、餌として、オタマジャクシにはケール粉末を、カエルにはうなぎ用配合飼料を自由摂取させた。飼育用の水は蒸留水を用いた。

3-2-2. 腸管内容物のイオン濃度測定

オタマジャクシは 0.01% MS222、カエルは 0.05% MS222 を含む水溶液に浸漬し、麻酔をかけた。麻酔後に腹部を正中切開し、胃噴門から直腸までを摘出した。カエルは胃体部 1 部位と腸を 3 等分 (腸 1~3)、オタマジャクシは腸を 4 等分 (腸 1~4) し、腸管長軸に沿って切開し、スパーテルで内容物を採取した。陽イオンはイオン分析計 (IA-300、東亜 DKK) を使用し、1 価 2 価陽イオン同時測定モードで Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 NH_4^+ 、 Mg^{2+} を測定した。 Cl^- 濃度測定は高感度 Cl^- 電極 (ISH/HS25C1、ラジオメーター社) を用いた。

3-2-3. ユッシングチャンバー法による電気生理学的測定

オタマジャクシの標本は直径 $1 \sim 2$ mm、カエルの標本は $2 \sim 3$ mm の円形窓のある一对のユッシングチャンバーに装着した。voltage clamp system (CEZ-9100 日本光電) に接続し、短絡電流および経上皮コンダクタンスを測定した。

3-3. ゲノム編集技術を用いたクローディン 15 欠損ラットの作出とその表現型解析

3-3-1. 改良型ゲノム編集法 (improved genome-editing via oviductal nucleic acids delivery, i-GONAD) i-GONAD 法

本実験では i-GONAD 法を用いてクローディン 15 遺伝子欠損ラットを作成した。RNA 依存性 DNA スクレアーゼとして、溶血性レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* に由来する spCas9 を用いた。ラットクローディン 15 exon 1 には 2 つの PAM 配列が存在したため、これらを含むガイド RNA を設計した。ジェノタイピングはラットの尾からゲノム DNA を抽出し、クローディン 15 遺伝子の exon 1 を PCR 反応で増幅し、その後シーケンスを行うことにより、遺伝子型を決定した。

3-3-2. 腸管内容物のイオン濃度測定

3-2 と同様におこなった。

3-3-3. ユッシングチャンバー法による電気生理学的測定

3-2 と同様におこなった。

4. 研究成果

4-1-1. 野生型マウスとクローディン 15 欠損マウスにおける高 Na^+ 食摂取量の検討

高 Na^+ 食における離乳前の仔マウスの摂取量を検討した。離乳前の仔マウスの各個体の摂取量を測定することは困難なため、親マウスを含むケージ全体の摂取量から推測した。マウスは生後 14 日齢から餌を食べ始めるため、親マウスの摂取量の影響が少なくなる考えられる 4 日齢を用いた。各ケージの仔マウス数はコントロール食 (5 匹)、 $1\%NaCl$ 食 (5 匹)、 $2\%NaCl$ 食 (11, 7 匹) であった。各ケージの平均値はコントロール食 $2.41g/日$ 、 $1\%NaCl$ 食 $3.07/日$ g、 $2\%NaCl$ 食 $2.19g/日$ であり、3 群間で摂取量に大きな差は見られなかった。

4-1-2. 腸管の長さや湿重量に対する高 Na^+ 食の効果の検討

次に小腸の肥大化に対する各 Na^+ 食の効果を検討した。マウスの体重は、野性型マウスと C1dn15K0 マウス間で有意な変化は見られなかった。餌の Na^+ 濃度による影響も観察されなかった。また小腸の長さはコントロール食、 $2\%NaCl$ 食のいずれでも有意差はなかった。しかし湿重量はコントロール食では WT マウスに比べ約 2 倍 ($p=0.000259$)、 $2\%NaCl$ 食でも、小腸の重量の増加が観察された。さらに詳細に形態変化を検討するために、小腸を 3 等分し、H&E 染色を行い、各部位の絨毛高を測定した。WT マウスでは S1 が約 $400 \mu m$ であり、S2 が約 $300 \mu m$ 、S3 が約 $200 \mu m$ と遠位部で漸次短くなってきており、これは過去の研究と一致した。C1dn15K0 マウスでは S1 が約 $600 \mu m$ 、S2 が $500 \mu m$ 、S3 が約 $200 \mu m$ と上部小腸の絨毛が長くなっており、C1dn15K0 マウスでは上部小腸で約 2 倍の絨毛高となっていた。次に絨毛高に対する高 Na 食の影響を観察した。野生型 $2\%NaCl$ 食では、S1 が約 $400 \mu m$ であり、S2 が約 $300 \mu m$ 、S3 が約 $150 \mu m$ と大きな変化は観察されなかった。C1dn15K0 マウスの $2\%NaCl$ 食では、S1 が約 $800 \mu m$ であり、S2 が約 $500 \mu m$ 、S3 が約 $200 \mu m$ であり、予想に反しコントロール食と比べ S1 での絨毛が長くなっていった。

4-1-3. 管腔内容物のイオン濃度に対する高 Na^+ 食効果の検討

次に摂取した $2\%NaCl$ により、腸管各部位での水分、 Na^+ および K^+ 濃度が変化するか検討した。胃から大腸における管腔内容物を採取し、水分量と Na^+ および K^+ 濃度を測定した。 $2\%NaCl$ 食の C1dn15K0 マウスの胃では、水分量はコントロール食より高かった。WT マウスと C1dn15K0 マウスで有意な変化は見られなかった。 Na^+ 濃度は食餌に関係なく、C1dn15K0 マウスで低かった。胃内では摂取した食事に濃度は依存するはずであるが、解剖時に内容物は少なく、このことが胃内の Na^+ 濃度に変化が観察されなかった理由と考えられた。 K^+ 濃度は、C1dn15K0 マウスで高く、 Na^+ 濃度と同様に食餌による変化はなかった。これらの結果より、C1dn15K0 マウスでは、摂取した餌に関係なく、管腔内 Na^+ 濃度が低く維持されていることが示唆される。また、 K^+ 濃度も高く保たれていた。

4-1-4. C1dn15K0 マウスにおける栄養素代謝機能の評価

Cldn15K0 マウスにおいては、腸管内の Na^+ 濃度が低下することにより、小腸 Na^+ 依存性栄養素吸収機構が障害されていることが示唆されている。このため、Cldn15K0 マウスにおいて、個体レベルで栄養素代謝が変化している可能性を考慮し、成獣マウス (17~36 週齢) を用いて、呼吸ガスを測定することで栄養素吸収機構を評価した。最初に自由摂食下でマウスを飼育し、明暗サイクルのみを変化させ、マウスの摂食タイミングと呼吸ガスがどのように変化するかを検討した。給餌開始後、1 時間で野生型、Cldn15K0 マウスいずれでも、RQ の変化が 0.7 から 1 に明確に変化し、脂肪代謝から炭水化物代謝に移行していることが示唆された。24 時間絶食を行うと、RQ は 0.9 から 0.7~0.8 に低下し、24 時間絶食後の 3 時間の再摂食では、低下した RQ は 0.9 程度まで上昇した。このことは Cldn15K0 マウスでは腸管内の Na^+ が低下しているために、グルコース吸収が低下していると解釈する以前の研究結果とは異なる解釈が必要であることを示唆している。いずれのマウスにおいても、グルコース摂取後すみやかにグルコースが腸管吸収され代謝基質として利用されていることが示唆された。

4-2 食性変化に伴う消化管の栄養素吸収機構の機能的解析

4-2-1 腸管内容物イオン濃度測定

幼生時のオタマジャクシは、 K^+ を多く含み Na^+ が少なく、セルロースが多い藻などを摂取している。しかし、その後変態期間を経て成体になると、腸は短くなり、 Na^+ を含み消化されやすい糖質やタンパク質を含むものを摂取する肉食へと食性が変化する。多くの栄養素は、細胞外液の Na^+ に依存した栄養素吸収機構で吸収されているため、食性の変化に対応し、腸管内のイオン濃度並びにイオン組成がどのように変化するのかを調べた。オタマジャクシには Na^+ 0.16 重量%、 K^+ 1.71 重量%、カエルには Na^+ 0.5 重量%、 K^+ 0.89 重量% を含む餌を与えた。最初にオタマジャクシの腸管内容物の陽イオン濃度の測定を行った。全腸を 4 等分し測定を行った。腸管内容物の Na^+ 濃度は、近位部である腸 1 から 4 ではそれぞれ、 25.7 ± 9.6 mM、 68.0 ± 9.1 mM、 60.7 ± 13.5 mM、 50.7 ± 7.4 mM であった。また、オタマジャクシの腸管内容物の K^+ 濃度は、腸 1 から 4 ではそれぞれ、 8.1 ± 0.5 mM、 11.7 ± 2.6 mM、 10.1 ± 0.8 mM、 7.9 ± 2.1 mM であり、部位ごとに大きな変化はなく、有意差はみられなかった。

次にカエルの腸管内容物の陽イオン濃度の測定を行った。腸管内容物 Na^+ 濃度は、胃で 23.7 ± 7.7 mM であった。カエルは全腸を 3 等分し測定した。腸 1 から 3 では 68.2 ± 8.1 mM、 73.9 ± 5.6 mM、 35.4 ± 9.5 mM となり、胃では低いが腸 1、腸 2 で有意に高くなり、腸 3 では有意に低下がみられた。また、カエルの腸管内容物 K^+ 濃度は、胃で 24.7 ± 9.7 mM、腸 1 で 4.7 ± 1.8 mM、腸 2 で 5.9 ± 2.3 mM、腸 3 で 11.5 ± 3.0 mM であり、胃と遠位側で濃度が高かった。

オタマジャクシでは、餌に Na^+ がほぼ含まれていないにもかかわらず腸 2、腸 3 では 68.0 ± 9.1 mM、 60.7 ± 13.5 mM と高い濃度の Na^+ が腸管内で維持されており、腸 1 の 2.6 倍の Na^+ が存在していたが、遠位部の腸 4 では濃度が低くなっていた。小腸で Na^+ が分泌され、遠位部で再び吸収されているのではないかと考えられる。このことから、 Na^+ 依存性の栄養素吸収機構が存在し、また何らかの Na^+ 分泌・再吸収機構も存在していることが示唆された。

一方、カエルにおける腸管内容物の Na^+ 濃度は、胃では 23.7 ± 7.7 mM、最も高濃度であった腸 2 では 73.9 ± 5.6 mM であり、胃内容物に比べて腸 2 では 3.1 倍 Na^+ 濃度が高かった。この結果より、オタマジャクシと同様に腸管内で Na^+ が分泌され、高く維持する機構が働いていることが示唆された。以上より、ほぼ Na^+ が含まれていない餌を摂取している草食のオタマジャクシでも、肉食のカエルと同等の Na^+ 分泌機構が存在しており、食性の違いによる Na^+ 分泌には差異がないのではないかと考えられた。

4-2-2. ユッシングチャンバー法による希釈電位の測定

腸管内容物のイオン濃度測定の結果より、オタマジャクシ・カエルともに、 Na^+ を分泌する機構が存在することが示唆された。腸管の Na^+ 代謝には、上皮細胞間のタイト結合のイオン透過性が重要であり、その責任分子の実体はクロージン 15 であることが示されている。ユッシングチャンバー法を用い、一側の代用液の Na^+ 濃度を希釈することで発生する希釈電位を測定し、細胞間隙の陽イオン選択性を評価した。オタマジャクシの腸における希釈電位の測定を行った。粘膜側の正電荷の増大を正として電位変化を観察したところ、腸 1~腸 3 すべてで変化がみられた。全腸を 3 等分したうち最も近位な腸 1 では 4.4 mV、腸 2 では 3 mV、最も遠位な腸 3 では 2.5 mV の電位変化がみられ、遠位になるにつれて希釈電位の発生が小さくなった。また、GHK 式より算出した陽イオン透過性を示す PNa/PCl は、腸 1 では 1.7、腸 2 では 1.4、腸 3 では 1.3 となり、近位部で Na^+ の陽イオン透過性が最も大きく、遠位部になるにつれて小さくなった。

次にカエルの腸における希釈電位の測定を行った。オタマジャクシと同様に電位変化を観察したところ、腸 1~腸 4 すべてで変化が観察された。全腸を 4 等分したうち最も近位な腸 1 では 7.6 ± 2.1 mV、腸 2 では 8.0 ± 1.4 mV、腸 3 では 9.7 ± 1.9 mV、腸 4 では 2.7 ± 1.7 mV の電位変化がみられ、腸 1 から腸 3 に向かうにつれて電位変化が大きくなり、腸 3 で最大となった。遠位部の腸 4 では電位変化が急激に小さくなった。

オタマジャクシでは、腸 1~3 すべてにおいて電位変化が観察され、このことから陽イオン選択性が示された。カエルでも腸 1~4 すべてにおいて電位変化が観察され、陽イオン選択性を持つことが示唆された。カエルでは腸 3 の部位で電位変化、 PNa/PCl ともに最大となり、近位部よりも比較的中央部において Na^+ 分泌機構が多く存在していることが示唆された。

4-2-3. ユッシングチャンバー法による Na^+ 依存性栄養素吸収機構の検討

オタマジヤクシ、カエルともに小腸では陽イオン選択性を示したことから、Na⁺依存性の栄養素吸収機構が働いているか否かを検討した。最初にNa⁺依存性グルコース吸収機構を観察した。ユッシングチャンパーに装着したオタマジヤクシの小腸の粘膜側に、グルコースを段階的に加えると、添加濃度の増大に伴って短絡電流の上昇が観察され、フロリジンの添加により上昇した短絡電流は元のレベルまで下がった。腸3では実験に供したすべての標本においてグルコース添加に伴う短絡電流上昇はみられなかった。腸1における短絡電流上昇値とグルコース濃度の関係は、グルコース濃度10 mMまで添加濃度の上昇に伴い飽和性を示し、Michaelis-menten速度論に従った。カエルでは、腸1、腸2、腸3において、グルコース添加に伴う短絡電流上昇がみられた。腸1では、10 mMまで段階的に短絡電流が上昇した。腸2、腸3では、5 mMまでは段階的な短絡電流の上昇がみられたが、10 mMでは短絡電流の低下がみられた。腸1ではフロリジンの添加により、上昇した短絡電流は元のレベルに戻った。しかし、腸2、腸3ではフロリジンの添加により、短絡電流は基線のレベル以下にまで減少した。

4-3-1

i-GONAD法によるクローディン15欠損ラットの作製

5匹の妊娠ラットにi-GONAD法でクローディン15のexon1をターゲットとしてゲノム編集を行ったところ、3系統のindel変異体が得られた。これらF0ラットを野生型Wistarと交配させ、F1のホモ変異体を作成し、ゲノムシーケンスを行い、生殖系列に遺伝子変異が導入されているかを確認した。Line1の交配をHetero型ラット(+/-)同士で2回行った。1回目は13匹が生まれ、野生型(+/+) : Hetero型(+/-) : Homo型(-/-) = 7 : 6 : 0であり、♂ : ♀ = 6 : 7であった。異なるペアで2回目の交配を行い、13匹が生まれた。野生型(+/+) : Hetero型(+/-) : Homo型(-/-) = 2 : 7 : 4であり、メンデルの法則におおよそ従った。♂ : ♀ = 9 : 4であり、Homo型(-/-)は♂ : ♀ = 2 : 2であり、明らかな雌雄差はなかった。Line3の交配は、合計4回行いHetero型ラット(+/-)同士、Hetero型ラット(+/-)とHomo型ラット(-/-)で行った。離乳した仔の遺伝子型は野生型(+/+) : Hetero型(+/-) : Homo型(-/-) = 1 : 2 : 2であり、♂ : ♀ = 2 : 3であった。Homo型はすべてメスであった。同様のペアで2回目のHetero型ラット(+/-)同士では、6匹が生まれ、野生型(+/+) : Hetero型(+/-) : Homo型(-/-) = 1 : 3 : 2であり、♂ : ♀ = 2 : 4であった。Hetero型ラット(+/-)♂とHomo型ラット(-/-)♀で交配を行った。4匹のラットが生まれHetero型(+/-) : Homo型(-/-) = 3 : 1であり♂ : ♀ = 2 : 2であり、Homo型(-/-)は♀1匹であった。2回目に異なるペアでHetero型ラット(+/-)♂とHomo型ラット(-/-)♀で交配を行った。7匹のラットが生まれHetero型(+/-) : Homo型(-/-) = 4 : 3であり♂ : ♀ = 2 : 2であった。Homo型(-/-)は♂ : ♀ = 2 : 1であった。これら2回の交配の結果からは、生まれたHomo型(-/-)の比は2 : 2であり、雌雄差はなかった。また、Homo型のメスは正常な受精能力を有しており、今回のゲノム編集が受精能力に影響していないことが示唆された。

4-3-2 クローディン15の腸管各部位での遺伝子発現

Line3のクローディン15欠損ラットと野生型のラットの腸管各部位からRNAを抽出し、クローディン15の遺伝子発現量をリアルタイムPCR法で検討した。クローディン15は、小腸①において野生型で7.5、クローディン15欠損型で0.86となり、欠損型の方が有意に低下した。小腸②、③においても小腸①と同様に、クローディン15欠損型では野生型の約1/10のmRNA発現量となり、有意に低下した。盲腸では、野生型で10、クローディン15欠損型で3.7となり、欠損型で有意に低下した。大腸①、②、③では、野生型とクローディン15欠損型の間に有意な差は見られなかったが、クローディン15欠損型でmRNAが低下傾向にあった。したがって、作出したクローディン15欠損ラットの腸管粘膜でクローディン15のノックアウトが行われていることが示唆された。

4-3-3. クローディン15欠損ラットの表現型の解析

クローディン15欠損マウスでは、小腸の外見上の大きな表現型変化としては、上部小腸が肥大化することである。このため、ラットの解剖時に腸管の長さを小腸、大腸それぞれ測定した。野生型ラット、クローディン15欠損ラットを5匹ずつ測定した。野生型及びヘテロ型ラットの平均は小腸49.8 cm、大腸12.25 cmであり、クローディン15欠損ラットは平均が小腸55.8 cm、大腸13.8 cmであり、クローディン15が欠損したラットが有意ではないが小腸と大腸ともに大きくなる傾向があった。しかし、本実験では標本数が少なく、雌雄や週齢数等に分類することができなかった。腸管の長さは雌雄や週齢数によっても変化することが考えられるため今後データ数を増加させて比較検討する必要がある。

4-3-4. クローディン15欠損による成長への影響

クローディン15欠損が個体の成長に影響するか検討を行った。離乳後4週齢目から8週齢目の期間、野生型ラットとクローディン15欠損ラットの体重を測定した。オスでは、野生型5匹、ホモ欠損型2匹で平均値の体重増加を比較したが、大きな変化は観察されなかった。また、メスにおいてもオスと同様に、野生型5匹、ホモ欠損型2匹で平均値の体重増加を比較したが、大きな変化は観察されなかった。以上よりクローディン15の遺伝子欠損は個体成長への影響はないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Noriko Ishizuka ,Mina Nagahashi ,Yuina Mochida ,Wendy Hempstock , Nozomi Nagata and Hisayoshi Hayashi	4. 巻 324
2. 論文標題 Na ⁺ -dependent intestinal glucose absorption mechanisms and its luminal Na ⁺ homeostasis across metamorphosis from tadpoles to frogs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol	6. 最初と最後の頁 R645-R655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpregu.00249.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 W. Hempstock, N. Nagata, N. Ishizuka and H. Hayashi	4. 巻 13
2. 論文標題 The effect of claudin-15 deletion on cationic selectivity and transport in paracellular pathways of the cecum and large intestine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-33431-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 W. Hempstock, N. Nagata, N. Ishizuka, H. Hayashi
2. 発表標題 Claudin-15 is the molecule responsible for the conductance and permselectivity of the murine cecum and large intestinal epithelia
3. 学会等名 Europhysiology 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 N. Nagata, W. Hempstock, N. Ishizuka, H. Hayashi
2. 発表標題 Luminal Na ⁺ concentration is preserved in claudin-15 knockout mice fed a high Na ⁺ diet
3. 学会等名 Europhysiology 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 N. Nagata, W. Hempstock, N. Ishizuka, H. Hayashi
2. 発表標題 Claudin-15 is responsible for the conductance and permselectivity of the murine cecum and large intestine
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塚本小雪、藤本優、尾形美晴、高林秀次、林久由
2. 発表標題 ラット小腸栄養素吸収機構におけるタイト結合を介したNa+リサイクリング機構の解明
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023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
---------	---------