

平成 22 年 5 月 6 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790150

研究課題名 (和文) 消化管における細胞間バリア機構の解明

研究課題名 (英文) The analysis of cell-cell barrier function in intestine

研究代表者

田村 淳 (TAMURA ATSUSHI)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教

研究者番号：00362525

研究成果の概要 (和文)：生体の各部位は上皮細胞の作るシート構造により区画され、ある一定の環境に維持される。今回の研究から、腸管におけるイオン環境の維持にとっては、クローディン 15 をベースとして作られるタイトジャンクションが非常に重要なことが分かった。腸管内のイオン環境は、栄養素吸収と直接に関連していることが知られており、生命の維持という観点からも、興味深い結果が得られた。さらに応用的な発展を目指す。

研究成果の概要 (英文)：Epithelial cell sheets have an important role in compartmentalizing internal tissues and maintaining their local homeostasis via intercellular barriers consisting of tight junctions. Using claudin-15 knockout mice, we proposed that claudin-15-based formation of tight junctions to organize was important for the ion like Na^+ microenvironment in the small intestine. As the absorption of many kinds of nutrients like glucose is coupled directly to Na^+ absorption, this result is essential for our life.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：タイトジャンクション、クローディン、ノックアウトマウス、腸管、ホメオスタシス

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の体内は、それぞれの機能に即した内部環境を持つ複数のコンパートメントに区分される。例えば、胆嚢内容と膀胱内容では、全く異なる組成を持ち、さらにこれらが体内で直接混合することはない。こうしたコンパートメントは、上皮細胞と呼ばれる細胞同士が横つながりに接着したシート構造により区画・維持される。上皮細胞間の接着は複数の接着分子複合体により維持されるが、それらの中でもタイトジャンクション(密着結合)は、シートを横切る物質のバリ

アーや選択的な透過性の維持をつかさどる閥門として欠くことのできない構造である。タイトジャンクションを構成する膜貫通蛋白質は複数知られているが、その中でも、クローディンと呼ばれるヒトやマウスでは 24 種類以上のサブタイプからなる、分子量およそ 20kDa の蛋白質は、タイトジャンクションの形成に必須であることが知られている。

タイトジャンクションにおけるクローディンの機能や構造への寄与については、培養細胞で多くの実験が行われ、その基本的な性質が明らかになった。一方、生体におけるク

ローディンの機能については、十分な解析は進んでいなかった。申請者は、腸管に発現の多いクローディン 15 ノックアウトマウスの解析を行うことで、生体におけるクローディンの構造および機能解析を目指した。クローディン 15 ノックアウトマウスには、腸管の炎症は認められず、上部腸管を中心とした肥大が認められた。また、3つの上皮細胞間に濃縮して存在するトリセルリンノックアウトマウスの作製と解析を目指した。

2. 研究の目的

クローディン 15 ノックアウトマウスでは腸管の肥大が認められたが、こうした表現型はクローディンというタイトジャンクション蛋白質の欠損とは直接的な相関が考えがたかった。そこで、初めに(1)バリアー機能の破綻の有無(2)タイトジャンクションの微細構造の変化の検討といったタイトジャンクションの変化について検討を行った上で、さらに、(3)バリアーの破綻と細胞増殖を結びつける仕組みの検討、を同時に進め、タイトジャンクションと細胞増殖ひいてはタイトジャンクションと組織形成の関係について検討を行う。バリアーの破綻についての解析は、イオンの選択的な透過性や小分子の透過性の変化についても含み、その結果として生じる腸管内外のホメオスタシスへの影響も含む。このことで、これまでタイトジャンクションが体内のホメオスタシスに重要といわれながらも検討に適した実験系がないために十分に証明されたいとはいえないホメオスタシス維持とタイトジャンクションの概念の確立を目指すことを目的とする。一方、3つの上皮細胞間に存在する細胞間隙はトリセルラーと呼ばれ、となり合う細胞間の接着(バイセルラー)とは異なる構造を持つと考えられている。トリセルラーに濃縮するタイトジャンクション蛋白質としてトリセルリンが同定された。そこで、(4)トリセルリンノックアウトマウスの作製と解析、を行うことで、生体におけるトリセルリンのタイトジャンクションの構造や機能における役割を解明することも目標とする。

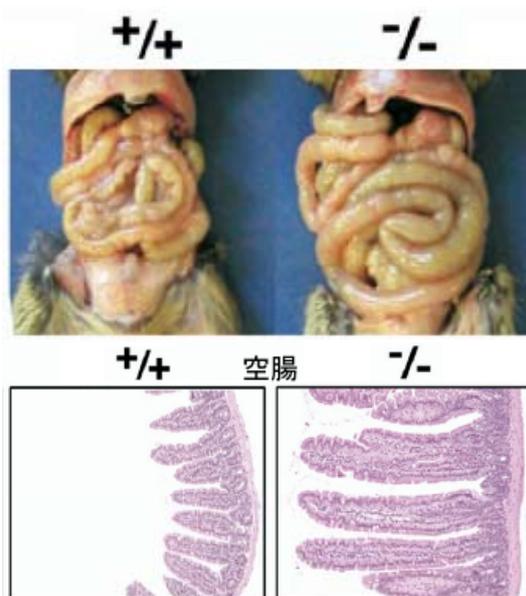
3. 研究の方法

すでに作製済みのクローディン 15 ノックアウトマウスを用いる。

(1)バリアー機能の破綻の有無；古典的な透過性試験であるビオチンやデキストランの透過試験に加え、2チャンバーを用いた電気生理学的な実験を行う。腸管を摘出し縦に切開し、筋層をピンセットを用いて実体顕微鏡下で剥離する。この腸管を2つの独立したチャンバーの間に挟む。2つのチャンバー間

には、直径 2-5mm の正円孔が開いており、絨毛側と漿膜側は、それぞれ別のバッファーに接することができる。こうして2つのチャンバーに挟まれた腸管に 5mV 程度の小さな電圧を加えたときに流れる電流を測定すると、オームの法則から、この腸管上皮細胞シートの電気の流れにくさの指標である電気抵抗や、流れやすさの指標であるコンダクタンスを求めることができる。さらに、こうした電気の流れやすさが変化した場合に、こういった種類のイオンの透過性が変化するか(すなわち、イオン全体の透過性が低下したのか、あるいはカチオンのみの透過性が変化したのか、など)を調べるために、拡散電位の測定を行った。拡散電位は、腸管を挟む2つのチャンバーのイオンの組成を変化させ特定のイオンの濃度勾配を付けた時に、膜の透過しやすさがイオンによって異なる場合に生じる電位を測定することで、膜の持つイオンの選択的な透過性を調べる方法である。例えば、もしナトリウムイオンと塩化物イオンの、腸管上皮細胞シートを横切る透過性が、ナトリウムイオンの方が高い場合、ナトリウムイオンが先行し塩化物イオンがそれに追従する形の双極子が生じるために、これが電圧として測定される。生体の主な細胞外液であるナトリウムと塩化物イオンの勾配を測定することで、生体での上皮細胞シートのイオン選択性を反映することができる。また、生体にはごく微量しか存在しないイオンを用いて、一般的なイオンチャネルとの特性の違いや類似性を比較することもできる。

(2)タイトジャンクションの微細構造の変化の検討といったタイトジャンクションの



(図 1)

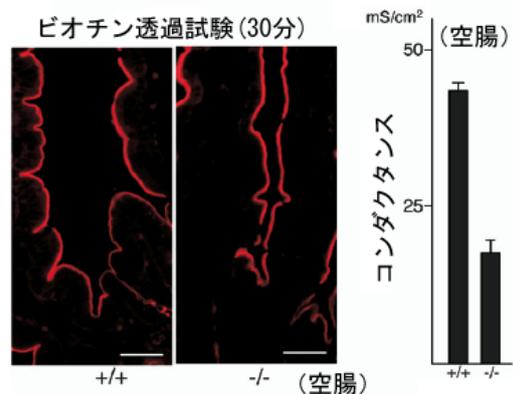
変化について検討；微細構造については、主に、電子顕微鏡を用いた検討を行う。具体的には、ノックアウトマウスと野生型マウスの (a) 超薄切片電子顕微鏡像；2分の1カルノフスキー液を用いた環流固定サンプルを作製し、ウランおよびオスミウムにより後固定を行う。その後、脱水系列、プロピレンオキシド、50%プロピレンオキシド:50%エポン、100%エポン包埋後樹脂化し、超薄切片を作製、電子染色し、加速電圧 80Kv の電子顕微鏡で観察を行った。(b) 凍結切断電子顕微鏡像；固定サンプルを、液体窒素中で切断し、走査型顕微鏡で観察した。(c) フリーズフラクチャー像；固定サンプルを 30%グリセロール置換後、凍結レプリカ作製装置で割り、白金蒸着後、蛋白質分解処理をしたサンプルをグリッドに拾い、電子顕微鏡で観察した。

(3) バリアーの破綻と細胞増殖を結びつける仕組みの検討；クローディン 15 ノックアウトマウスに見られた腸管の増大 (図 1) といった、タイトジャンクションの変化にともなう細胞増殖の変化、については、これまでに報告のない新しい点で、定まった実験はなく、複数の切り口を考えた新しい実験を行う必要がある。クローディンというタイトジャンクションを構築する蛋白質の欠損でまず考えられるのは、バリアー障害であり、腸管内容物内に存在する EGF (上皮成長因子、5.6kDa) がクローディン 15 ノックアウトマウスでは障害されバリアーが弱くなったタイトジャンクションを通り、細胞のバソラテラルに存在する EGF レセプターに結合することが考えられる。そこで、腸管内に EGF を添加し、その後の EGF レセプターのシグナルの動きを、レセプターのリン酸化状態で検討する。また、タイトジャンクションの変化が周囲に及ぼすのは、まず微小環境の変化と考えられるので、腸管の絨毛やクリプトの間質の pH やナトリウムなどのイオンの濃度変化について、蛍光標識物質を使って測定する。さらに、そうした微小環境の変化が、細胞内の pH やイオン環境にも影響しているかについて調べる。特に、試薬の投与が生体内の微小環境を変化させないように十分な配慮が必要で、その点は、特に難しい。試薬が十分な濃度を与えるように高濃度の試薬の投与を行うとともに、体液や微小環境の希釈をもたらさないように、極少量の試薬を投与することで、対応を計る。

4. 研究成果

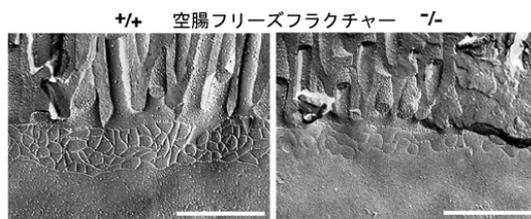
ノックアウトマウスのビオチンやデキストラン透過性試験では、ノックアウトマウスと野生型マウスの腸管上皮細胞の透過性に

ついては、有意な差は認められなかった (図 2 左)。ノックアウトマウスの微細形態観察を行ったフリーズフラクチャー実験では、クローディン 15 ノックアウトマウスのタイ



(図 2)

トジャンクションストランドは、野生型マウスのストランドに比べ丸みを帯び、さらに、非薄で途切れがちであった (図 3)。微細形態と透過性を比較した古典的な実験結果か



(図 3)

らは、ストランドの厚みや複雑さとタイトジャンクションのバリアーの強さはおおよそ平行関係にあるといわれて来たので、クローディン 15 ノックアウトマウスの腸管で、ビオチン透過試験の結果で有意差が得られなかったのは、非常に不思議に思われた。そこで、ビオチン (440Da) よりさらに小さなイオンについての解析では、ノックアウトマウスで透過性が亢進していると予想して、2チャンネルを用いたイオンの透過性試験を行った。予想に反して、やはり、イオンのようなより小さな物質でも、クローディン 15 ノックアウトマウスにおける透過性が、野生型マウスに比べ大きく低下していた。こうしたイオンの透過性の低下が、こういった種類のイオンの透過性低下に由来するかを確認する目的で、さらに上皮細胞シートを挟んだイオン組成を変えることで拡散電位を得ると、ノックアウトマウスでは 1 価カチオンの選択的な透過性が、大きく低下していることが分かった。このことから、クローディン 15 は腸管におけるカチオンの透過性に主要な役割を担うことが示唆された。実際、腸管内容物を採取してそのイオン組成を比べてみると、

ナトリウムイオン濃度が大きく低下するとともに、カリウムイオン濃度が上昇していることが分かった。クローディンには、ポアを作るタイプのクローディンと、バリアーを作るタイプのクローディンの2種があることが最近示されるようになって来ており、腸管におけるクローディン15は、ポアを作るタイプのクローディンであることが示唆された。また、ストランドの複雑性とバリアーについては、必ずしも平行関係がないことをはっきりと示すことができた。以上のように、クローディン15が腸管のイオンホメオスタシスを担う主要なクローディンであることが分かった。このことは、腸管の絨毛やクリプトのイオン環境やpHを変化させる可能性を示唆する。そこで、BCECFといった蛍光pHインジケータやCoroNaGreenといった蛍光ナトリウムイオンインジケータを用いて、絨毛やクリプトの細胞や間質の環境に変化について、検討を行っている。この測定については、絨毛内へのインジケータの浸透など、改善の余地があり、現在、測定検討を続行中である。(マウス尾静脈からの投与では、絨毛部まで十分に均一な試薬の投与が得られていない。)と、ところで、ナトリウムは、腸管からのグルコースの吸収の駆動力になるので、腸管内のナトリウムイオン濃度の低下は、腸管からのグルコースの吸収を低下させる可能性が示唆された。現在、こうした栄養の吸収とナトリウムイオンとの関係を検討中である。グルコース吸収が低下していることが予想され、このことが、代償機構としての腸管の肥大をもたらす可能性も示唆された。生命の維持に取って栄養分の吸収は根本的な問題である。栄養素の吸収に必要な環境の形成にタイトジャンクションが必須であることを示すことは生体レベルでは十分に証明されていない。そういった点でも、本研究は大きな意味を持つ可能性があると考えられる。ただし、この点については、十分な検討の余地が残されている。特に、クローディン15ノックアウトマウスでのグルコース吸収が低下している場合になぜマウス個体そのものの発育に影響がでないか、という点である。腸管の肥大がある程度の代償機構として働いている可能性はあるが、エネルギー代謝は、グルコース代謝ばかりではなく、蛋白質代謝や脂質代謝とも関連し、さらに、腸管内に留まらず、肝臓や脂肪組織とのやり取りも互いに関連するので、全身のエネルギー出納を念頭に置いた実験系の立ち上げが必要と考える。トリセルリンマウスについては解析を開始しており、将来持続して検討の

予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Tamura, A., Kitano, Y., Hata, M., Katsuno, T., Moriwaki, K., Sasaki, H., Hayashi, H., Suzuki, Y., Noda, T., Furuse, M., Tsukita, Sh., and Tsukita, Sa. 2008. Megaintestine in claudin-15-deficient mice. *Gastroenterology* 134:523-534. 査読有り

② Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., Tsukita, Sh., and Tsukita, Sa. 2008. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol. Biol. Cell* 19:2465-2475. 査読有り

[学会発表] (計5件)

① 月田 早智子、山崎 裕自、田村 淳、2009年10月21日、神戸、日本、細胞間隙イオン輸送担体としての細胞間接着分子クローディン、第82回日本生化学会大会

② 田村 淳、2009年10月21日、神戸、日本、細胞間カチオンチャネルとしてのクローディンノックアウトマウスの解析から、第82回日本生化学会大会

③ Atsushi Tamura, Mitsunobu Imazato, Yuji Yamazaki, Mikiō Furuse, Tetsuo Noda, Shoichiro Tsukita, and Sachiko Tsukita, September 21, 2009, Kyoto, Japan, Paracellular Na⁺-permeative Claudin-15-2 based homeostasis, proliferation, and inflammation in mouse intestine. ASCB/JSCB/RIKEN CDB 2009 Summer Meeting Building the Body Plan: How Cell Adhesion Signaling and Cytoskeletal Regulation Shape Morphogenesis

④ Sachiko Tsukita, Atsushi Tamura, and Shoichiro Tsukita, July 30, 2009, Kyoto, Japan, Role of claudin-15 and related claudins: Knockout-mice analyses, The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009)

⑤ 月田早智子、野島久、田村淳、2008年10月28日、名古屋、日本、上皮細胞特有の細胞間接着性の特性と細胞増殖、第67回日本癌学会学術総会

6. 研究組織

(1) 研究代表者：田村 淳 (TAMURA ATSUSHI)
大阪大学・生命機能研究科・特任助教
研究者番号：00362525

(2) 研究分担者：該当なし

(3) 連携研究者：該当なし