

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590236

研究課題名（和文）小腸ナトリウム依存性糖吸収におけるタイト結合の陽イオン選択性の意義

研究課題名（英文）Physiological significance of tight junction cation selectivity for Na-dependent sugar absorption in the small intestine.

研究代表者

鈴木 裕一 (SUZUKI YUICHI)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授)

研究者番号：50091707

研究成果の概要（和文）：ほ乳類小腸において、グルコースはじめ多くの栄養素の吸収がナトリウムイオン依存性能動輸送により起こることが知られている。本研究で得られた結果から、これらの能動輸送過程に必要なナトリウムイオンの大部分が、小腸上皮細胞間をシールしているタイト結合部を介して血液側から管腔内側に供給されていること、さらに、この供給ルートを担う主要なタンパク質はクラウジン-15であること、が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Glucose and many other nutrients absorption in the mammalian small intestine are mediated by Na-dependent active transport mechanism. The present results have suggested that Na required for these processes is rapidly supplied from the blood side to the lumen through the tight junction, and claudin-15 play a major role in this pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：上皮機能・消化吸収・能動輸送・トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

多くの栄養素は Na に依存した二次性能動輸送で小腸上皮から吸収される。グルコースの場合、頂側膜にグルコースと Na を 1 : 2 の比で輸送する共輸送体があり、これを介して栄養素は Na の電気化学的ポテンシャル勾配を利用して細胞内に効率よく取り込まれ蓄積する。次いで栄養素は側底膜上のトランスポーターを介して血液側に放出される。一方、側底膜上には Na/K 交換ポンプ

(Na, K-ATPase) が存在し、取り込まれた Na を血液側に汲み出すとともに、頂側膜の取り込みに必要な Na の電気化学的ポテンシャル勾配を維持している。このグルコースとともにその 2 倍量の Na も吸収されることが、経口補液療法の根拠となっている。しかし本当にグルコースの 2 倍量の Na の吸収が起こっているのだろうか？やや意外ではあるが、自然状態の小腸において実際にグルコース吸収に伴いどれだけの Na が吸収されている

かについて検討した報告は見当たらない。また、2倍量のNa吸収が起こっているとすると矛盾する事実もある。すなわち、摂取されたグルコースの2倍量のNaが管腔内に供給されなければならないが、食事に含まれる、あるいは消化液として分泌されるNaはおおよそ1モル/日にすぎない。この量は糖質の摂取量(=吸収量、グルコース1.5モル)とNa/グルコース輸送比(=2)から予想される必要量の1/3にすぎない。さらに糖以外にもNaに依存して吸収される栄養素が多くあることを考えれば、食事や消化液以外にも別の何らかのNa供給メカニズムがなければならないと考えられる。

上皮細胞の管腔側近くにはタイト結合部がある。タイト結合部は基本的には上皮細胞同士をつなぎとめると同時にバリアーとしても機能を果たしているが、さらに上皮を横切ったイオン選択性を持つ透過路(傍細胞経路:受動輸送と特性を持つ)としても機能している。近年月田らによりタイト結合部のタンパク質クロージンファミリーが同定され、さらにそれらを培養上皮細胞系に発現させるとメンバーにより異なったイオン選択性を持つ透過路が形成されること、またその変異によりイオン選択性が変化することが示され、クロージンがタイト結合部のイオン透過性を制御していることが明らかになった。タイト結合部の選択的イオン透過性は、尿細管でのミネラル再吸収や上皮細胞分化にも重要な役割を果たしていることも知られている。

小腸の上皮のタイト結合部はイオン透過性が高い(電気的な抵抗が低い)こと、陽イオン選択的であることが知られている。電気的な抵抗が低いことは、Na/K交換ポンプを中心として発生する側底膜の起電力が、そこを介して頂側膜の膜電位を過分極方向にシフトさせNaとの共輸送体の輸送効率を高める効果がある。しかしこの効果はタイト結合部の電気抵抗が低い(イオン透過性が高い)必要はあるが、必ずしも陽イオン選択性でなくてもよく、特に陽イオン選択性である生理的意義は不明のままであった。腸管上皮にはクロージン2, 3, 4, 7, 12, 15などが発現している。このうちクロージン15は小腸絨毛部に多く、発現させるとNaイオン選択性の透過路を形成することが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、クロージン15一欠損マウスを利用し、Na依存性グルコース吸収において、タイト結合部を介して血液側からのNaの供給がおこり、それがグルコース吸収を支えていることを明らかにする。タイト結合の選択的イオン透過性を持つ新たな生理的役

割が明らかになるとともに、より有効な経口補液法への手掛かりも得られるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 選択的イオン透過性の変化(ユッシング法による電気的パラメータの測定)

摘出した下部空腸を、筋層を剥離後、ユッシングチャンバーに装着した。コンダクタンスは外電圧負荷による電流の変化量より求めた。また拡散電位はチャンバーの一側の代用液のNaCl濃度を半減(等浸透圧のマニトールで置換)させた際に発生する電位差を測定した。

(2) 腸管運動の変化、腸管内の糖質の消化吸収と水・電解質代謝の変化(代謝ケージを用いた実験)

飼料の組成は、水分7.9%(重量)、蛋白質23.1%、脂質5.1%、灰分5.8%、繊維2.8%、可溶性無窒素物55.3%、ナトリウム0.19%(重量)、カリウム0.9%(重量)、クロライド0.31%(重量)である。粉末状にして摂取させた。

動物は、馴化させるため5日間代謝ケージで飼育した。摂食時間は10:00~15:00とし、水は自由摂取させた。実験当日(6日目)は飼料に非吸収性のマーカーとして14Cでラベルしたポリエチレングリコール(PEG)を2%(重量)加えた。

実験当日に、餌を与え始めた時間から3~5時間後に屠殺した。胃噴門から大腸までを摘出し、腸管各部位を胃(S)、小腸6等分(S1~S6)に分け、内容物を回収した。各内容物は、重量測定後、80°Cで1日間乾燥させ、乾燥重量を求めた。重量低下から内容物の水分重量を求めた。ついで一定量の蒸留水を加え攪拌後、遠心して上清を採取した。また実験当日の屠殺時間までの摂食量を測定した。

腸管内容物の14C-PEGは液体シンチレーション法で、腸管内容物のK、Na濃度はイオンメーターを用いて、Cl濃度はイオンアナライザーを用いて夫々測定した。また、グルコース濃度はグルコースオキシダーゼ法により測定した。

(3) 小腸グルコース吸収とNa吸収の量的関係の変化(小腸灌流実験)

マウスをウレタンで麻酔し、動物用恒温装置の上に仰臥位に固定した。開腹後、空腸の一部(約5cm)を露出させ上端と下端にカニューレを接続し、ペリスタポンプ約185 μ l/minの速度で灌流した。流出液は一定時間ごとに回収した。流入液と流出液のそれぞれの流速、グルコース濃度、Na濃度を測定し、流入量と流出量の差より吸収速度を求め、実験終了後に測定した灌流部位の長さで割って、腸管の長さ当りの吸収速度として表した。グルコース濃度は酵素法(グルコースCII-テスト

ワコー 和光純薬)により、Na 濃度はイオンメーター (コンパクトイオンメーター 堀場製作所) により求めた。

灌流液は下記組成を用いた。

灌流用管腔液組成 (mM)

K ₂ HPO ₄	7
KH ₂ PO ₄	7
NMDG-Cl	110
NaCl	15
CaCl ₂	1.2
MgCl ₂	1.2
Glucose	5
100%O ₂ , pH=6.8	

4. 研究成果

(1) 空腸のコンダクタンスを測定するとクロージン 15 欠損マウスでは野生型マウスに比較し、コンダクタンスが低下していた。また拡散電位は野生型マウスでは管腔側 NaCl 濃度を半減させると、粘膜側正電位の増加が観察されたが、クロージン 15 欠損マウスでは、正電位の増加は観察されなかった。この結果は、ナトリウムイオンとクロライドイオンの透過性の比 (PNa/PCl) を算出すると、クロージン 15 欠損マウスでは PNa/PCl が低下していることを示唆している。これらのことは小腸上皮の陽イオン透過性にはクロージン 15 が重要であること示唆して

(2) 腸管運動の変化、腸管内の糖質の消化吸収と水・電解質代謝の変化

①餌の摂食量

野生型に比べクロージン 15 欠損マウスでは、摂食量がやや少なかった。初めの 2 時間で野生型マウスでは一日量の 69.9 ± 9.1% を摂取し、クロージン 15 欠損マウスでは 51.9 ± 4.4% を摂取していた。それ以降 5 時間後までの摂食量は、両群で差がなかった。

②胃排泄速度

食餌から摂取した PEG 量と胃内の PEG 量の差から、その時間までに胃を通過して小腸に入った PEG の累積胃排泄量が求まる。胃排出速度が一定である仮定して PEG の流量、MPEG、を計算したところ、野生型マウスで 0.043 ± 0.008 μmol/min、クロージン 15 ノックアウトマウスで 0.033 ± 0.009 μmol/min であった。この値を以下の解析に用いた。

③小腸各部位での内容物の滞留時間および通過時間

腸管各部位内の PEG 量と上述の PEG の胃排出速度 MPEG を用いて小腸滞留時間および小腸通過時間を求めた。野生型マウスでは、S1 で短く、S2 以降は滞留時間の増加が見られ、S4 で最も長く、それ以降は滞留時間の短縮が観察された。一方クロージン 15 欠損型マウスでは野生型マウスと異なり、S1 から S3 で長くそれより遠位側の部位では滞留時間の短縮が観察された。クロージン 15 欠損型で

は野生型に比べ小腸の肥大化しており、(野生型 33cm、クロージン 15 欠損型 45cm) 単位 cm 当たりで補正した値を比較すると、S3-S4 でほぼ同じで、それより近位部ではクロージン 15 欠損型が、遠位部では野生型が長い滞留時間を示した。また、小腸通過時間は小腸内の内容物の移動の平衡化が示唆された摂食後 3 時間以降、野生型マウスでは 55.2 ± 6.5min、クロージン 15 ノックアウトマウスでは 74.5 ± 6.5min かかることが観察された。

④内容物の水分量と電解質濃度

小腸各部位ごとに小腸の長さ当たりの水分量を比較したところ、近位部では野生型群に比べ Claudin-15 欠損群で水分量が多かった。ただし、遠位部では低下しその差がほとんどなくなった。

小腸各部位ごとの Na イオン濃度を比較すると、野生型群では小腸全体にわたって 80mM 前後であるのに対し、クロージン-15 欠損群では徐々に低下し S2 以下では 20 mM 以下にまで低下した。ただし、S6 では再び 40mM まで上昇した。小腸各部位ごとの K イオン濃度を比較すると、Na イオン濃度分布の場合と逆に、野生型群では 50 mM 以下と低く、クロージン-15 欠損群で 100-150mM と高い値を示した。さらに、小腸各部位ごとの Cl イオン濃度を比較すると、野生群とクロージン-15 欠損群ともに、上部でやや高く (約 50 mM) 中位になると少し低下し (約 30 mM)、その値はほぼ等しかった。しかし後半部では、野生型で再び増加 (約 50 mM) する傾向を示したのに対して、クロージン欠損群ではそのような増加する傾向は見られなかった。

⑤腸管内容物のグルコース濃度の比較

腸管各部位におけるグルコース濃度を測定したところ、胃 (S) には約 50mM の遊離グルコースが存在していたが、使用した餌にはわずかながら遊離のグルコースが含まれており、それを反映したものと考えられる。小腸では、野生型マウスのグルコース濃度は S2 で約 145mM と最も高い値を示したが、S4 以降は約 7mM と低下した。クロージン 15 欠損型では野生型に比べ小腸の遠位側である S4、S5 でも約 33mM、14mM と高いグルコース濃度が観察された。腸管管腔内に存在するグルコースは、炭水化物の分解による産生と腸管のグルコース吸収能力の差を反映すると考えられる。欠損型では近位部の小腸に滞留する時間が長いにも関わらずより遠位にまでグルコースが存在することから、グルコース吸収能力の低下が起こっている可能性が高いと考えられる。

(3) 小腸グルコース吸収と Na 吸収の量的関係

野生型マウスで灌流実験を行ったところ、グルコースを含まないマンニトール液で空腸を灌流した時、血液側 (5-10mM グルコース

濃度)から管腔内へのグルコース流入はほとんど見られなかったが、Naの管腔内への流入が観察された。この実験では管腔内を灌流する液のNa濃度は15mMのため、血液中の140mMとの間の濃度勾配による管腔内への流入が、能動輸送によるNa吸収量を上回ったと考えられる。実際灌流液のNa濃度を生理的な小腸内濃度の80mMまで上げると、正味のNa吸収が見られた。空腸を灌流する液(Na=15mM)をマンにトール液からグルコースを含む液に変えたところ、一定のグルコース吸収が観察された。しかしNa吸収に関してはグルコース吸収に伴い増加(分泌が低下)することなく、むしろ分泌がやや増大する傾向を示した。すなわちNa吸収がグルコース吸収に伴い増大するという事は観察されなかった。

次に同様の実験をクロージン15欠損マウスで行った。コントロールのマンにトール液を灌流した場合、野生型マウスと異なり、Na吸収が観察された。グルコース吸収速度は野生型マウスに比べ大きな差はなかった。クロージン15欠損マウスでは、空腸の絨毛が巨大化していることからグルコース吸収活性は増大していることが予想されたが、この結果は、吸収細胞あたりの吸収活性はむしろ低下していることを示唆している。クロージン15欠損マウスにおいては野生型マウスでは見られなかったグルコース吸収に伴うNa吸収活性の増加がみられた。この増大したNa吸収速度はグルコース吸収速度とほぼ見合う値であった。この結果は、野生型マウスでは、グルコース吸収に伴い吸収されるNaの大部分はクロージン15が関与する陽イオン選択性のタイト結合部を介して管腔内へリサイクルしているとの考えを支持するものと考えられる。

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3件)

① Inagaki-Tachibana, E., Tsukahara, T., Kaji, K., Eguchi, R., Kanazawa, H., Hayashi, H. and Suzuki, Y. Involvement of DNA fragmentation of enterocytes in mucosal injury to a mouse jejunum incubated in Ussing chambers, Nagoya J Med Sci, 71:11-18 (2009)

② Ikehara O, Hayashi H, Watanabe Y, Yamamoto H, Mochizuki T, Hoshino M, Suzuki Y. Proteinase-activated receptors-1 and 2 induce electrogenic Cl⁻ secretion in the mouse cecum by distinct mechanisms. Am J Physiol. 299, G115-125(2010).

③ Tamura A, Hayashi H, Imasato M, Yamazaki

Y, Hagiwara A, Wada M, Noda T, Watababe M, Suzuki Y. and Tsukita S. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. Gastroenterology. 140(3):913-923, (2011)

[学会発表] (計5件)

① Kenta Nozaki, Hisayoshi Hayashi, Atsushi Tamura, Sachiko Tsukita and Yuichi Suzuki. The sodium absorption associated with active glucose absorption in perfused mouse jejunum in vivo. 36th International Congress of Physiological Sciences, (京都), 2009年7月

② 野崎健太、林久由、田村淳、月田早智子、鈴木裕一 「小腸タイト結合部のイオン透過性の生理的役割の検討」第56回中部日本生理学会(金沢)2009年12月

③ 林久由、野崎健太、田村淳、月田早智子、鈴木裕一 「ナトリウム依存性グルコース吸収における細胞間経路のナトリウム透過性の役割」第87回日本生理学大会(盛岡)2010年5月

④ 林久由、鈴木裕一、田村淳、月田早智子 「Na⁺-依存性グルコース吸収におけるタイト結合部のNa⁺透過性の役割」第83回日本生化学大会(神戸)2010年12月

⑤ 鈴木裕一、林久由 「腸管上皮タイト結合部の陽イオン選択透過性のNa⁺依存性栄養素吸収における役割」第65回日本栄養・食糧学会大会(東京)2011年5月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木裕一 (SUZUKI YUICHI)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：50091707