

研究区分	教員特別研究推進 独創・先進的研究
------	-------------------

研 究 テーマ	ゲノム編集ラットでの小腸バリア機能の解析				
研究組織	代 表 者	所属・職名	食品栄養科学部・准教授	氏名	林 久由
	研究分担者	所属・職名	浜松医科大学・准教授	氏名	高林 秀次
		所属・職名	食品栄養科学部・助教	氏名	ヘムストック ウェンディ
		所属・職名		氏名	
	発 表 者	所属・職名	食品栄養科学部・准教授	氏名	林 久由

講演題目
ゲノム編集ラットでの小腸バリア機能の解析
研究の目的、成果及び今後の展望
【研究の目的】小腸は生体の恒常性維持に不可欠な器官であり、栄養素の選択的吸収と外界である管腔内からの異物の侵入を防ぐバリア機能を担っている。これらの機能を小腸に付与しているのは、一層の腸管上皮細胞であり、上皮細胞は隣接する細胞間とタイト結合で密に結合しバリアを形成している。我々は、タイト結合のバリアタンパク質を欠損させた遺伝子改変マウスを用いて、その生理機能を解析してきた。しかし、マウスは小型で検体採取量が限られ、実験的制約があった。一方、ラットは体重が大きく実験操作が容易であるが、ES細胞が確立されておらず、遺伝子改変が困難であった。近年、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術の発展により、ラットにおいても遺伝子改変が可能となった。タイト結合は多種類のタンパク質で構成されるが、クローディンファミリーはバリア機能の主要な構成要素である。特にクローディン15は小腸タイト結合に選択的に発現し、Na⁺選択的透過経路を形成することが遺伝子改変マウスで報告されている。本研究では、クローディン15欠損ラットを作製し、その表現型を解析することで、ラット小腸におけるクローディン15の生理的役割を明らかにすることを目的とした。 【方法】改良型ゲノム編集法（i-GONAD）を用いてクローディン15欠損ラットを作製し、野生型ラットと比較解析を行った。腸管内容物を採取し、Na⁺濃度、K⁺濃度、水分量を測定した。さらに、反転腸管法およびUssingチャンバー法を用い、小腸上皮の電気生理学的特性を評価した。 【成果および考察】クローディン15欠損ラットでは、成長障害は認められなかったが、遺伝子改変マウスで報告されている小腸の巨大化および腸管内容物のNa⁺濃度低下が観察され、クローディン15がラット小腸においても小腸Na⁺代謝に関与する可能性が示唆された。タイト結合部のイオン透過性をUssingチャンバー法で評価したところ、クローディン15欠損ラットでは野生型と比較して経上皮電気コンダクタンスが有意に低下していた。しかし、NaCl濃度を等浸透圧的に希釈した際の電位差測定では、野生型と欠損ラットの間に有意な差は認められず、クローディン15の欠損が小腸タイト結合の陽イオン選択性に及ぼす影響は明確ではなかった。そこで、反転腸管法を用いて詳細な解析を行った結果、クローディン15欠損ラットでは野生型と比較して希釈電位が有意に低下しており、ラットにおいてもクローディン15がタイト結合部の陽イオン選択性に寄与することが示唆された。本研究により、ラットにおけるタイト結合の陽イオン透過性の分子機構が明らかとなり、今後、小腸Na⁺代謝と全身のNa⁺恒常性の関係解明への貢献が期待される。