

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 望月鉄之祐

本論文は腸管上皮細胞におけるタウリン輸送のサイトカインによる調節について述べたもので序論および 4 章からなる。序論では、研究の背景と目的を述べている。タウリンは細胞内に遊離した状態で存在する含硫アミノ酸であり、様々な生理作用が知られている。食品として摂取されたタウリンは、腸管上皮のタウリン輸送担体(taurine transporter:TAUT)を介して生体内に吸収される。この腸管上皮 TAUT は細胞外環境変化や食品因子により制御、調節を受けることがこれまでに明らかにされてきた。本研究では、TAUT を制御する新たな因子としてサイトカインに注目し、tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) が TAUT 活性を亢進することを見出した。そこで、その制御メカニズムとこの現象の持つ生理的な意義について検討を行った。

第 1 章では、サイトカインが腸管上皮の TAUT 活性に及ぼす影響について、ヒト腸管上皮細胞のモデルである Caco-2 細胞を用いて検討している。まず、プレート上で培養した Caco-2 細胞をサイトカインで刺激し、トリチウムラベルされたタウリンを含んだハンクス液で 37 $^{\circ}$ C、10 分間インキュベートして、その際に細胞内に取り込まれたトリチウム量を測定してタウリン輸送活性(TAUT 活性)とした。その結果、TNF- $\alpha$  で約 2 倍の TAUT 活性の亢進がみられた。TNF- $\alpha$  による TAUT 活性の亢進は TNF- $\alpha$  濃度依存的かつ TNF- $\alpha$  作用時間依存的であった。また、TNF- $\alpha$  により細胞内タウリン量が増加することも分かった。さらに、タウリン以外のアミノ酸や他の組織由来の細胞株を用いた解析から、TNF- $\alpha$  は腸管上皮という特定の部位で TAUT 活性を特異的に亢進させていることが示唆された。TNF- $\alpha$  処理の有無による TAUT 活性の Kinetics 解析やノーザン解析により、この制御にはタウリン輸送担体数の増加、基質との親和性の増加、TAUT mRNA の発現量の増加が関与していることが示唆された。

第 2 章では、TNF- $\alpha$  による TAUT 制御における転写因子 NF- $\kappa$ B の関与について検討している。まず、NF- $\kappa$ B 活性化の阻害剤を 4 種類用いて、それらを TNF- $\alpha$  とともに細胞に作用させ、TAUT 活性亢進に対する影響を調べた。その結果、4 種類の阻害剤はいずれも TNF- $\alpha$  による TAUT 活性の亢進を有意に抑制した。最も強い阻害効果のみられた pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) は、TNF- $\alpha$  による TAUT mRNA の発現増加を抑制した。PDTC は TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B の活性化についても抑制作用を示した。さらに、ヒト TAUT 遺伝子 5'上流約 2.4kbp に存在する NF- $\kappa$ B のコンセンサス様配列に NF- $\kappa$ B が結合し、転写レベルでヒト TAUT 遺伝子を制御している可能性も示唆された。

第 3 章では、この制御における NF- $\kappa$ B 以外の情報伝達物質の関与について検討して

いる。まず、いくつかの情報伝達阻害剤を用いて TAUT 活性への影響を調べた。その結果、c-Jun N-terminal kinase(JNK) の阻害剤が TAUT 活性の亢進を抑制した。この阻害剤は、TNF- $\alpha$  による TAUT mRNA の発現増加や NF- $\kappa$ B の活性化を抑制しなかったことから、JNK は NF- $\kappa$ B とは別経路で機能していることが示唆された。また、この制御における TNF- $\alpha$  のレセプターの関与について、レセプターの中和抗体を用いて検討したところ、TNF レセプター-1 が関与していることが示唆された。TNF レセプター-1 の下流には TNF receptor associated factor 2( TRAF2 )があることが知られている。そこで、TRAF2 ノックダウン細胞を用いて TNF- $\alpha$  による TAUT 活性の亢進への影響を調べたところ、TRAF2 も TAUT 制御に関わっていることが示唆された。

第 4 章では、マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞と Caco-2 を透過性膜を隔てて複合培養した系を用いて検討がなされている。この複合培養系では、TNF- $\alpha$  を介した Caco-2 の細胞障害が誘導される。この複合培養系においてタウリンを作用させると、タウリン濃度依存的に Caco-2 の細胞障害が抑制された。このことから、タウリンには TNF- $\alpha$  が原因で起こる腸管上皮の炎症性損傷を和らげるという新たな生理作用があることが示唆された。また、THP-1 の培養上清が Caco-2 の TAUT 活性を亢進させることも見出された。

総合討論では、本研究の課題や意義についての考察がなされている。

以上、本研究は、腸管上皮細胞のタウリン輸送が TNF- $\alpha$  により調節されることを明らかにし、生体がタウリンの持つ抗炎症的な生理作用を積極的に利用する機構を有することを示したもので学術上応用上寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位として価値あるものと認めた。