

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 玄子 實

カドミウムは工業的利用率の高い金属であるが、イタイイタイ病の原因物質として、また国産米の汚染問題で注目されている。カドミウムは汚染された食品を介して腸管で吸収され、血液循環により体内の各組織に移行するが、体外への排泄には長期間を要することが報告されている。*In vivo* 実験の報告からは、腸管上皮における高濃度のカドミウムの蓄積も考えられる。一方、腸管は食品成分の吸収や認識、有害な化学物質の排除を行っている器官である。また、腸管上皮層は外部からの刺激に対して粘膜免疫活動の場として生体防御に関わることが知られている。経口摂取されたカドミウムの大部分が腸管上皮層に留まることを考えると、カドミウムが腸管上皮の免疫活動に及ぼす影響を解析することは非常に重要である。本論文は、カドミウムが腸管上皮細胞に与える影響について、主としてカドミウムによる腸管上皮の損傷機構、特に腸管炎症機構の解明という視点から検討しているもので、序論と5章、総合討論から構成されている。

序論では、研究の背景になる食品の安全性及びカドミウムの汚染現象を紹介するとともに、本研究の意義と目的について述べている。

第一章では、カドミウムが腸管上皮細胞の一般的特性に及ぼす影響を調べている。ヒト結腸癌由来株化細胞Caco-2細胞層をカドミウム添加培地で培養し、細胞層の電気抵抗値、細胞間隙透過のマーカであるLucifer yellowの透過量、および細胞毒性の指標である乳酸脱水素酵素(LDH)量の変化を測定した。その結果、80mM以上のカドミウムはCaco-2細胞に対する細胞毒性を有し、細胞間隙透過性を亢進させることが示された。一方、細胞毒性を示さない低濃度のカドミウム処理ではCaco-2細胞層の性質に顕著な変化は誘導しなかった。

第二章では小腸上皮様に分化させたCaco-2細胞に、細胞毒性を示さない濃度である50mMのCdCl₂を添加して培養した後、DNA microarrayを用いた遺伝子発現プロファイル解析を行い、腸管上皮での炎症反応に関わる因子への影響に着目して調べた結果を述べている。その結果、炎症性サイトカインであるIL-8のmRNAについて有意な発現増加が観察された。一方、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β など、他の炎症性サイトカイン発現に対するカドミウムの影響は認められなかった。

第三章では、腸管上皮細胞における炎症性サイトカイン遺伝子発現へのカドミウムの影響を *in vivo* で確かめるため、カドミウムをマウスに経口投与し、腸管組織での遺伝子発現変動を調べた。

その結果、カドミウム投与3時間経過後から、IL-8のマウス homologue である MIP-2 の急激な発現変化が認められた。このことから、カドミウムによる腸管での炎症性サイトカイン IL-8 発現誘導は、培養細胞系のみならず実際の腸管組織においても起こることが示された。

第四章では、腸管上皮におけるカドミウムによる IL-8 分泌亢進機構を解析するため、real-time PCR 法及び ELISA 法を用いた分析を行い、カドミウム処理によって IL-8 mRNA 発現レベル及び IL-8 タンパク質の分泌誘導が起こるかどうかが調べている。まずレポーターアッセイを用いてカドミウムに対して応答する因子を検索し、NF- κ B consensus element の存在が IL-8 応答に重要であることを示した。このことは、NF- κ B 阻害剤処理や、NF- κ B 応答配列 mutant vector の導入 Caco-2 細胞および NF- κ B 応答配列ノックダウン細胞での IL-8 転写活性の減少によって確認された。さらに、カドミウムが NF- κ B の subunit である p65 の核内移行及び I- κ B の分解を促進することを western blotting 法で確認し、カドミウムによる腸管上皮細胞での IL-8 分泌亢進は転写レベルでの調節であり、その機構は I- κ B 分解を介する NF- κ B 活性化によるものであることを明らかにした。

第五章では、放射性カドミウムを用いて Caco-2 細胞へのカドミウム取り込み測定系を構築し、カドミウム取り込みへの食品成分の阻害効果について述べている。その結果、卵黄タンパク質分解ペプチド(yolk peptide)と casein calciumpeptide に顕著なカドミウム取り込み阻害効果が観察された。ゲルろ過クロマトグラフィーの分析から、yolk peptide の阻害効果においては、ペプチドによるカドミウム吸着が主要な機構であることが示された。

以上要するに、本研究は、カドミウムの腸管上皮細胞における炎症性サイトカイン IL-8 の産生誘導現象及びその機構として NF- κ B 経路の重要性を提示するとともに、カドミウムの腸管吸収を抑制しうると考えられるペプチド性食品成分とその抑制機構の一端を明らかにしたもので、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)の学位論文として価値あるものと認めた。